

USO EXCLUSIVO D.P.I.

21	N° Solicitud	11	N° Registro
	2346 2003		
43	Fecha de Publicación		
22	Fecha de Solicitud	45	Fecha de Registro

SOLICITUD DE PATENTE

12	TIPO DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL	PRIORIDAD <table border="1"> <tr> <td>31</td> <td>N°</td> <td>US N° 60/426,107</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>FECHA</td> <td>13 del 11 del 2002</td> </tr> <tr> <td>33</td> <td>PAIS</td> <td>USA</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>N°</td> <td>US N° 60/426,282</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>FECHA</td> <td>13 del 11 del 2002</td> </tr> <tr> <td>33</td> <td>PAIS</td> <td>USA</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>N°</td> <td>US N° 60/426,226</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>FECHA</td> <td>13 del 11 del 2002</td> </tr> <tr> <td>33</td> <td>PAIS</td> <td>USA</td> </tr> </table>	31	N°	US N° 60/426,107	32	FECHA	13 del 11 del 2002	33	PAIS	USA	31	N°	US N° 60/426,282	32	FECHA	13 del 11 del 2002	33	PAIS	USA	31	N°	US N° 60/426,226	32	FECHA	13 del 11 del 2002	33	PAIS	USA	DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> PODER <input checked="" type="checkbox"/> CESIÓN <input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO
31	N°	US N° 60/426,107																												
32	FECHA	13 del 11 del 2002																												
33	PAIS	USA																												
31	N°	US N° 60/426,282																												
32	FECHA	13 del 11 del 2002																												
33	PAIS	USA																												
31	N°	US N° 60/426,226																												
32	FECHA	13 del 11 del 2002																												
33	PAIS	USA																												
54	TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD METODOS DE TRATAMIENTO DEL CANCER Y METODOS RELACIONADOS																													
71	SOLICITANTE (Razón Social y/o Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico) CHIRON CORPORATION 4560 HORTON STREET EMERYVILLE, CA 94608-2916 USA																													
74	REPRESENTANTE (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico) CLARKE MODET & CO CHILE LIMITADA HUERFANOS 835, OF 1001-PISO 10° Tel: (56-2)3699888 Fax: (56-2) 3609050 E-Mail: info@clarkemodet.cl SANTIAGO CHILE																													
72	INVENTOR O CREADOR (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico) <table border="0"> <tr> <td>HANNAH ALISON</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> <td>SAMARA EMIL</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> </tr> <tr> <td>HARWOOD ERIC</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> <td>SHANG XIAO</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> </tr> <tr> <td>HEISE CARLA</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> <td>VORA JAYESH</td> <td>INDIO</td> </tr> <tr> <td>HAROLDSSEN PETER</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> <td>ZHU SHUGUANG</td> <td>CANADIENSE</td> </tr> <tr> <td>MACHAJEWSKI TIMOTHY</td> <td>ESTADOUNIDENSE</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			HANNAH ALISON	ESTADOUNIDENSE	SAMARA EMIL	ESTADOUNIDENSE	HARWOOD ERIC	ESTADOUNIDENSE	SHANG XIAO	ESTADOUNIDENSE	HEISE CARLA	ESTADOUNIDENSE	VORA JAYESH	INDIO	HAROLDSSEN PETER	ESTADOUNIDENSE	ZHU SHUGUANG	CANADIENSE	MACHAJEWSKI TIMOTHY	ESTADOUNIDENSE									
HANNAH ALISON	ESTADOUNIDENSE	SAMARA EMIL	ESTADOUNIDENSE																											
HARWOOD ERIC	ESTADOUNIDENSE	SHANG XIAO	ESTADOUNIDENSE																											
HEISE CARLA	ESTADOUNIDENSE	VORA JAYESH	INDIO																											
HAROLDSSEN PETER	ESTADOUNIDENSE	ZHU SHUGUANG	CANADIENSE																											
MACHAJEWSKI TIMOTHY	ESTADOUNIDENSE																													
De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.839 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos.		USO EXCLUSIVO D.P.I. RECEPCIÓN																												
78.773-320-4 Nombre / Firma Representante		Nombre y Firma Solicitante																												

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y MÉTODOS RELACIONADOS

Referencias a solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/478916, presentada el 16 de Junio de 2003; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/460369, presentada el 3 de abril de 2003; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/460327, presentada el 3 de abril de 2003; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/460493, presentada el 3 de abril de 2003; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/460328, presentada el 3 de abril de 2003; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/426204, presentada el 13 de noviembre de 2002; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/426226, presentada el 13 de noviembre de 2002; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/426282, presentada el 13 de noviembre de 2002; la Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/426107, presentada el 13 de noviembre de 2002, y la Solicitud Provisional de los EEUU titulada "Métodos para tratar el cáncer y métodos relacionados", presentada el 7 de noviembre de 2003, cada una de las cuales se incorpora por completo y para todo propósito a modo de referencia, como se indica en la presente documentación.

Campo de la invención

[0002] Esta invención se relaciona con métodos de tratamiento del cáncer con un inhibidor de la tirosin quinasa receptora. La invención también se relaciona con métodos para medir las cantidades y concentraciones del inhibidor y sus metabolitos después de la administración del inhibidor a un sujeto.

Antecedentes de la invención

[0003] Los capilares llegan hasta casi todos los tejidos del cuerpo humano y

suministran oxígeno y nutrientes, retirando al mismo tiempo los productos de desecho. Bajo condiciones típicas, las células endoteliales que recubren los capilares no se dividen, y, por lo tanto, los capilares no aumentan de tamaño o en número en un humano adulto. Sin embargo, bajo determinadas condiciones normales, tal como cuando se daña un tejido, o durante determinadas partes del ciclo menstrual, los capilares comienzan a proliferar con rapidez. Este proceso de formación de capilares nuevos a partir de vasos sanguíneos pre-existentes se conoce como angiogénesis o neovascularización. Véase Folkman, J. *Scientific American* 275, 150-154 (1996). La angiogénesis durante la curación de lesiones es un ejemplo de neovascularización fisiopatológica durante la vida adulta. Durante la curación de lesiones, los capilares adicionales proveen un suministro de oxígeno y nutrientes, promueven la granulación del tejido y contribuyen a la eliminación de desechos. Después de terminar el proceso de curación, los capilares normalmente se retraen. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, Universidad de Helsinki, Laboratorio de Biología Molecular/Cáncer y Departamento de Patología, Haartman Institute, (1999).

[0004] La angiogénesis también tiene una función importante en el crecimiento de las células cancerosas. Se sabe que una vez que un nido de células cancerosas alcanza un tamaño determinado, de aproximadamente 1 ó 2 mm de diámetro, las células deben generar un suministro de sangre con el fin de permitir que el tumor crezca más, ya que la difusión no sería suficiente para proporcionar suficiente oxígeno y nutrientes a las células cancerosas.

[0005] Las tirosina quinasas receptoras (RTK) son polipéptidos transmembrana

que regulan el desarrollo y la diferenciación de las células, la remodelación y la regeneración de los tejidos adultos. Mustonen, T. et al., *J. Cell Biology* 129, 895-898 (1995); van der Geer, P. et al. *Ann Rev. Cell Biol.* 10, 251-337 (1994). Se sabe que ligandos polipeptídicos conocidos como factores de crecimiento o citoquinas activan las RTK. La señalización de las RTK comprende la unión del ligando y el desplazamiento conformacional del receptor, lo que resulta en su dimerización. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, Universidad de Helsinki, Laboratorio de Biología Molecular/Cáncer y Departamento de Patología, Haartman Institute, (1999); Ullrich, A. et al., *Cell* 61, 203-212 (1990). La unión del ligando a la RTK resulta en la transfosforilación del receptor en residuos específicos de tirosina y la activación subsiguiente de los dominios catalíticos para la fosforilación de sustratos citoplasmáticos. Id.

[0006] Dos subfamilias de RTK son específicas para el endotelio vascular. Éstas incluyen la subfamilia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la subfamilia del receptor Tie. Las RTK de clase III incluyen VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3. Shibuya, M. et al., *Oncogene* 5, 519-525 (1990); Terman, B. et al., *Oncogene* 6, 1677-1683 (1991); Aprelikova, O. et al., *Cancer Res.* 52, 746-748 (1992).

[0007] Se han descrito miembros de la subfamilia VEGF como capaces de inducir la permeabilidad vascular y la proliferación de células endoteliales, y se los identifica adicionalmente como inductores mayores de la angiogénesis y la vasculogénesis. Ferrara, N. et al., *Endocrinol. Rev.* 18, 4-25 (1997). Se sabe que VEGF se une específicamente a RTK, incluyendo VEGFR-1 y VEGFR-2.

DeVries, C. et al., Science 255, 989-991 (1992); Quinn, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 7533-7537 (1993). VEGF estimula la migración y la proliferación de las células endoteliales, e induce la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. Connolly, D. et al., J. Biol. Chem. 264, 20017-20024 (1989); Connolly, D. et al., J. Clin. Invest. 84, 1470-1478 (1989); Ferrara, N. et al., Endocrino. Rew. 18, 4-25 (1997); Leung, D. et al., Science 246, 1306-1309 (1989); Plouet, J. et al., EMBO J 8, 3801-3806 (1989).

[0008] Como se sabe que la angiogénesis es crítica para el crecimiento del cáncer y es controlada por VEGF y VEGF-RTK, se han realizado esfuerzos sustanciales para desarrollar agentes terapéuticos que sean antagonistas de VEGF-RTK con el fin de inhibir o demorar la angiogénesis, y, posiblemente, interferir o detener la proliferación tumoral.

[0009] La quinasa receptora del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRK) es otro tipo de RTK. Se ha demostrado la expresión de PDGF en una cantidad de tumores sólidos diferentes, desde glioblastomas hasta carcinomas de próstata. En estos distintos tipos de tumores, la función biológica de la señalización de PDGF puede variar desde la estimulación autocrina del crecimiento de las células cancerosas hasta interacciones paracrinas más sutiles que comprenden el estroma adyacente y la angiogénesis. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la PDGFR quinasa con pequeñas moléculas puede interferir con el crecimiento y la angiogénesis tumoral.

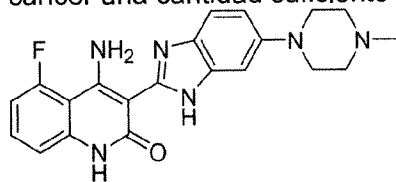
[0010] La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona es una pequeña molécula inhibidora de VEGF-RTK, PDGF-RTK y otras tirosina quinasas receptoras, tales como el receptor del

factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-RTK). Este compuesto ha sido descrito en una patente y varias solicitudes de patentes, cuyas descripciones completas se incorporan en la presente documentación a modo de referencia y para todos los propósitos: Patente de los EEUU N° 6605617, U.S.S.N. 10/644055, Solicitudes Provisionales de los EEUU N° 60/405729, 60/428210 y 60/484048. Se necesitan métodos específicos para administrar este compuesto, al igual que métodos para determinar el perfil metabólico de este potente agente anti-cáncer.

Resumen de la invención

[0011] La presente invención provee métodos de tratamiento del cáncer, incluyendo leucemias y tumores sólidos. En particular, se proveen métodos para obtener niveles en sangre de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en un sujeto suficientes para inhibir el crecimiento de un cáncer. Este compuesto es un inhibidor de las tirosina quinasas receptoras. Se proveen otros compuestos como marcadores biológicos y métodos para usar dichos compuestos para monitorear la distribución y el metabolismo del inhibidor en un sujeto. Además, la presente invención provee composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden el inhibidor, y sus métodos de uso.

[0012] Por consiguiente, de acuerdo con la invención, se proveen métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula I:



I

una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad administrada del compuesto es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 35 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 70 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, se administra la sal de lactato del compuesto de fórmula I al sujeto, y, en algunas de dichas realizaciones, el sujeto es un humano. El compuesto, los tautómeros o las sales del mismo pueden formularse como píldoras, tabletas, cápsulas de gel, pastillas,

suspensiones, soluciones acuosas u otras formas, como se describe en la presente documentación. En algunas de dichas realizaciones, la sal de lactato está en solución acuosa y se administra por vía oral al sujeto humano. En otras realizaciones, puede administrarse el compuesto por inyección.

[0013] En otro aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener entre aproximadamente 10 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad administrada del compuesto es suficiente para obtener entre aproximadamente 20 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, entre aproximadamente 40 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. Comúnmente, en los presentes métodos de tratamiento del cáncer, se administra la sal de lactato del compuesto de

fórmula I al sujeto. En algunas de dichas realizaciones, la sal de lactato está en una píldora, una cápsula, una tableta, una cápsula de gel, una pastilla, una suspensión o una solución acuosa, y se administra por vía oral al sujeto humano.

[0014] Por consiguiente, en algunas realizaciones de los presentes métodos de tratamiento del cáncer, se administra el compuesto de fórmula I como una composición farmacéutica o un medicamento que comprende fructosa. En algunas de dichas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente saborizante, tal como un sabor de mandarina tetarome. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende además agua. Por consiguiente, los presentes métodos de tratamiento del cáncer pueden comprender además mezclar el compuesto de fórmula I sólido con agua para formar una mezcla acuosa, antes de administrar el compuesto al sujeto. La invención provee además el uso del compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento del cáncer.

[0015] En otras realizaciones de los métodos de tratamiento del cáncer que se describen en la presente documentación, se administra el compuesto como una composición farmacéutica que se selecciona entre gránulos, polvos, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel, pastillas, emulsiones, jarabes, elixires, pastas, rocíos, aerosoles, supositorios o soluciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica se selecciona entre tabletas, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel o pastillas.

[0016] En aún otras realizaciones de los métodos de tratamiento del cáncer que se describen en la presente documentación, se administra el compuesto por inyección como un bolo pequeño, una infusión lenta o una infusión a largo

plazo. La inyección puede administrarse una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces por día.

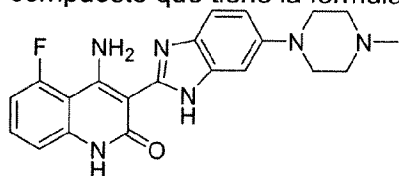
[0017] En algunas realizaciones de los presentes métodos de tratamiento del cáncer, la cantidad del compuesto de fórmula I administrada al sujeto varía entre 0,25 y 30 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otras realizaciones, la cantidad de compuesto administrada al sujeto varía entre aproximadamente 25 y 1500 mg/día y, preferiblemente, entre aproximadamente 200 y 500 mg/día.

[0018] Los presentes métodos de tratamiento del cáncer son efectivos contra una amplia variedad de cánceres, incluyendo aquellos donde el cáncer a tratar es un tumor sólido o una leucemia. En particular, pueden usarse los presentes métodos para tratar cánceres tales como cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, carcinoma de células pequeñas, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedades mielo-proliferativas, cáncer de células pulmonares no pequeñas, cáncer de células pulmonares pequeñas, leucemia linfocítica crónica, sarcoma, melanoma, linfoma, cáncer de tiroides, cáncer neuroendócrino, cáncer de células renales, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal del estroma, glioma, cáncer de cerebro o cáncer de vejiga.

[0019] En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento del cáncer que se describen en la presente documentación comprenden además administrar el compuesto de fórmula I como parte de un ciclo de tratamiento. Por consiguiente, el ciclo de tratamiento puede comprender administrar la cantidad de compuesto de fórmula I diariamente por 7, 14, 21 ó 28 días, seguidos por 7 ó 14 días sin administrar el compuesto. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento comprende administrar la cantidad de compuesto diariamente por 7

días, seguidos por 7 días sin administrar el compuesto. Puede repetirse un ciclo de tratamiento una o más veces para obtener un curso de tratamiento. Además, puede administrarse el compuesto una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces durante la fase de administración del ciclo de tratamiento. En otras realizaciones, los métodos comprenden además administrar la cantidad de compuesto una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces por día, o día por medio, durante un curso de tratamiento.

[0020] Se proveen además métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto que tiene la fórmula:

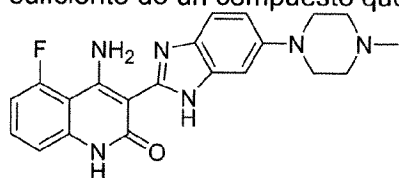


una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener una AUC de entre aproximadamente 500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 750 y 120000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En otras de dichas realizaciones, la cantidad administrada del compuesto es suficiente para obtener una AUC de entre aproximadamente 1000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 1500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En otras de dichas realizaciones, la AUC es de entre aproximadamente 2000 y 15000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 3000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0021] La presente invención provee además métodos de tratamiento del

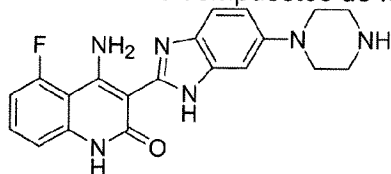
cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, donde la cantidad administrada de compuesto en un primer ciclo de tratamiento es de 25 mg por día, y la cantidad administrada de compuesto aumenta con cada ciclo de tratamiento hasta que se administran 1500 mg de compuesto por día al sujeto o se observa una toxicidad limitante de la dosis en el sujeto. Típicamente, en dichos métodos, la cantidad administrada de compuesto se duplica con cada ciclo de tratamiento subsiguiente después del primero. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento comprende administrar la misma cantidad de compuesto diariamente por 7 días, seguidos por 7 días sin administrar el compuesto.

[0022] En otro aspecto, la invención provee métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto que tiene la fórmula I

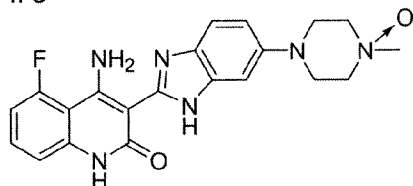


I

una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, y exponer al sujeto a uno o ambos compuestos de fórmula II y formula III, que se seleccionan entre:



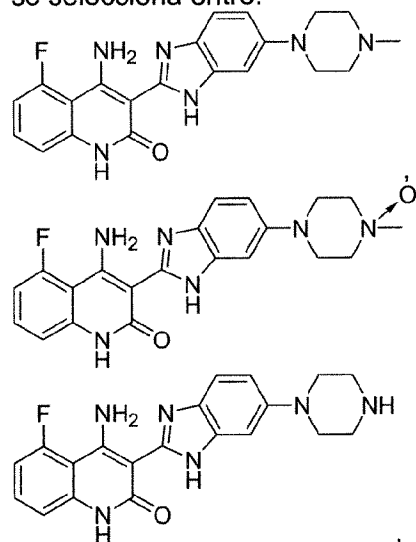
II o



III,

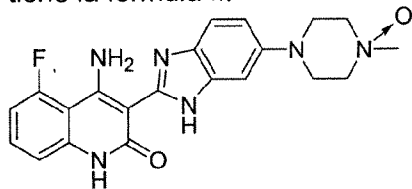
donde se producen uno o ambos compuestos de fórmula II y formula III a través del metabolismo del compuesto de fórmula I por el sujeto, para obtener una $C_{\text{máx}}$ combinada para uno o más de los compuestos de fórmula I, formula II, y formula III que varía entre aproximadamente 20 y aproximadamente 4000 ng/ml en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ combinada para uno o más de los compuestos de fórmula I, formula II y formula III que varía entre aproximadamente 40 y aproximadamente 8000 ng/ml en la sangre del sujeto.

[0023] En aún otro aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento del cáncer que comprenden exponer un sujeto que tiene cáncer a una cantidad suficiente de uno o más compuestos que tienen una fórmula que se selecciona entre:



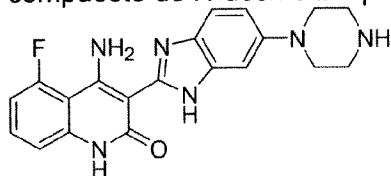
un metabolito activo del mismo, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, suficiente para obtener una $C_{m\acute{a}x}$ combinada de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml de uno o más compuestos en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ combinada de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml de uno o más compuestos en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más compuestos provee una $C_{m\acute{a}x}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 35 y 2600 ng/ml en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 35 y 6000 ng/ml en la sangre del sujeto. En otras realizaciones, la cantidad de uno o más compuestos provee una $C_{m\acute{a}x}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 35 y 1200 ng/ml en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 50 y 2400 ng/ml en la sangre del sujeto.

[0024] En otros aspectos de la invención, se proveen métodos para determinar un perfil metabólico para un compuesto de fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto, donde el método comprende medir la cantidad de al menos un metabolito del compuesto en una o más muestras de orina, sangre o tejido tomadas del sujeto. En algunas de dichas realizaciones, al menos un metabolito es un compuesto de N-óxido que tiene la fórmula II:



II

[0025] En otras de dichas realizaciones, al menos un metabolito es un compuesto de N-desmetilo que tiene la fórmula III:



III

[0026] En algunas de dichas realizaciones, el al menos un metabolito incluye además un segundo metabolito que es un compuesto de N-óxido de fórmula II. Puede medirse la cantidad de metabolitos usando técnicas que incluyen espectroscopia ultravioleta (UV) y/o cromatografía líquida-espectroscopía de masa (LC-MS).

[0027] En otros aspectos de la invención, se proveen métodos para determinar la cantidad de un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico en un sujeto, donde los métodos comprenden medir la cantidad del compuesto en una muestra de orina, sangre o tejido tomada del sujeto después de administrársele el compuesto. Este método puede comprender además medir la cantidad de un metabolito del compuesto en la muestra. Los metabolitos que pueden medirse incluyen, sin limitaciones, el compuesto de N-óxido de fórmula II y/o el compuesto de N-desmetilo que tiene la fórmula III. En algunas realizaciones, el método comprende además tomar una o dos muestras más del sujeto en distintos momentos después de administrársele el compuesto de fórmula I.

[0028] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán

evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, deberá comprenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican determinadas realizaciones de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración, ya que serán evidentes varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención para aquellos entrenados en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

[0029] La FIG. 1 muestra la inhibición del tumor KM12L4a por el compuesto de fórmula I.

[0030] La FIG. 2 muestra los valores de $C_{\text{máx}}$ y AUC versus el porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor KM12L4a en ratones portadores del tumor KM12L4a.

Descripción detallada

[0031] La presente invención se relaciona con métodos para el tratamiento del cáncer que usan el compuesto de fórmula I, métodos para medir la cantidad del compuesto de fórmula I y/o sus metabolitos en muestras biológicas tomadas de un sujeto, y composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden el compuesto de fórmula I, y métodos para su uso.

[0032] Se usan los siguientes términos y frases, como se los define en la presente documentación, a lo largo de esta memoria descriptiva.

[0033] Como se lo emplea en la presente documentación, "AUC" se refiere al área debajo de la curva en un gráfico que representa la concentración de un compuesto en plasma sanguíneo en función del tiempo.

[0034] Como se lo emplea en la presente documentación, " $C_{\text{máx}}$ " se refiere a la concentración máxima de un compuesto en el plasma, los tejidos o la sangre

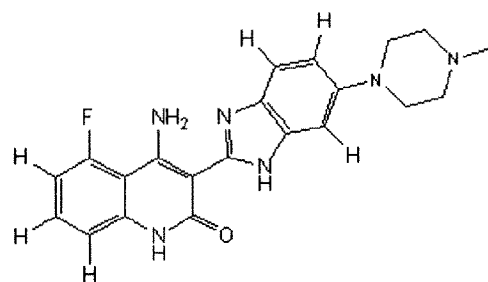
de un sujeto al cual se le ha administrado el compuesto. Se verifica $C_{m\acute{a}x}$ típicamente varias horas después de la administración de un compuesto a un sujeto.

[0035] Se define la toxicidad limitante de la dosis de acuerdo con los Criterios de Terminología Común de Efectos Adversos, versión 3.0 (CTCAE). Por consiguiente, se verifica una toxicidad limitante de la dosis después de la administración de un compuesto a un sujeto si se observa cualquiera de los siguientes sucesos dentro de un ciclo de tratamiento con una droga: neutropenia de grado 4 (es decir, conteo absoluto de neutrófilos (ANC) 500 células/mm^3) por 5 o más días consecutivos, o neutropenia febril (es decir, fiebre de $38,5^{\circ}\text{C}$ con una ANC $1000 \text{ células/mm}^3$); trombocitopenia grado 5 (es decir, $25000 \text{ células/mm}^3$ o episodios de hemorragia que requieren de la transfusión de plaquetas); fatiga grado 4, o una declinación de dos puntos en las estadísticas de desempeño ECOG; náusea grado 3 o mayor, diarrea, vómitos, y/o mialgia a pesar del uso de intervención médica adecuada/máxima; toxicidad no hematológica grado 3 o mayor (excepto fatiga); demora de un nuevo tratamiento de más de 2 semanas debido a una recuperación demorada de la toxicidad relacionada con un tratamiento con el compuesto **1**; toxicidad cardíaca de grado 2 o mayor de significación clínica (por ejemplo, una declinación en la fracción de eyección en reposo a 40% - 50%, o de la fracción de acortamiento a 15% - 24%; troponina cardíaca T $0,05 \text{ ng/ml}$).

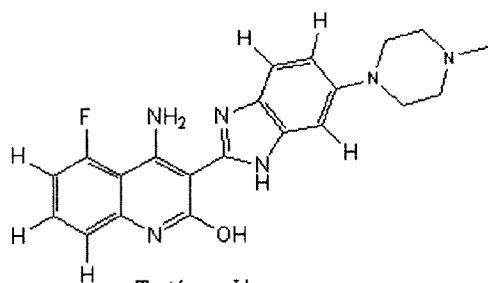
[0036] Las sales aceptables para uso farmacéutico incluyen una sal con una base inorgánica, una base orgánica, un ácido inorgánico, un ácido orgánico, un aminoácido básico o ácido. Como sales de bases inorgánicas, la invención incluye, por ejemplo, metales alcalinos, tales como sodio o potasio, metales

alcalinos térreos, tales como calcio y magnesio, aluminio, y amonio. Como sales de bases orgánicas, la invención incluye, por ejemplo, sales de trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, y trietanolamina. Como sales de ácidos inorgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido borhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Como sales de ácidos orgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, sales de ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metansulfónico, ácido bencensulfónico y ácido p-toluensulfónico. Como sales de aminoácidos básicos, la presente invención incluye, por ejemplo, sales de arginina, lisina y ornitina. Los aminoácidos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico.

[0037] Debería comprenderse que los compuestos orgánicos de acuerdo con la invención pueden mostrar el fenómeno de tautomerismo. Como las estructuras químicas en esta memoria descriptiva pueden representar solamente uno de las formas tautoméricas por vez, deberá comprenderse que la invención abarca cualquier forma tautomérica de la estructura presentada. Por ejemplo, se muestra el compuesto de fórmula I a continuación con un tautómero, el Tautómero la:

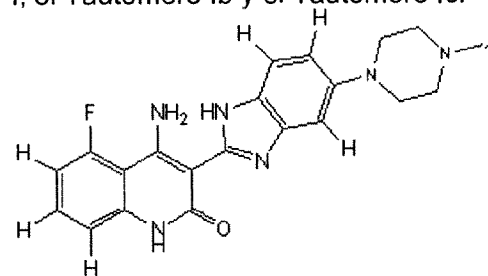


I

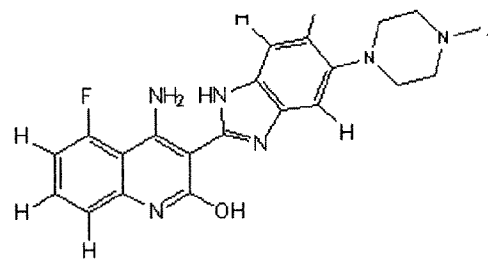


Tautómero IA

[0038] Se muestran a continuación otros tautómeros del compuesto de fórmula I, el Tautómero Ib y el Tautómero Ic:



Tautómero IB



Tautómero IC

[0039] Como lo comprenderán fácilmente aquellos entrenados en la técnica,

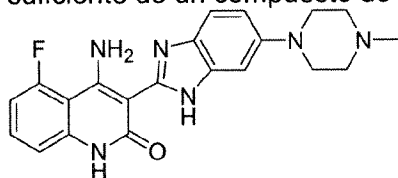
una amplia variedad de grupos funcionales y otras estructuras pueden mostrar tautomerismo, y todos los tautómeros de los compuestos que tienen la fórmula I están dentro del alcance de la presente invención.

[0040] El término “sujeto”, como se lo usa en la presente documentación, se refiere a cualquier animal que puede experimentar los efectos beneficiosos de los métodos de la invención. Por consiguiente, puede administrarse un compuesto de fórmula I, sales del mismo aceptables para uso farmacéutico, tautómeros del mismo o una sal aceptable para uso farmacéutico del tautómero a cualquier animal que pueda experimentar los efectos beneficiosos del compuesto, de acuerdo con los métodos de tratamiento del cáncer provistos por la invención. Preferiblemente, el animal es un mamífero y, en particular, es un ser humano, aunque la invención no pretende limitarse a estos últimos. Los ejemplos de otros animales apropiados incluyen, sin limitaciones, ratas, ratones, monos, perros, gatos, ganado, caballos, cerdos, ovejas y semejantes.

[0041] “Tratamiento”, en el contexto de la presente invención, significa el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o la detención de la progresión o el empeoramiento de estos síntomas, o la prevención o la profilaxis de la enfermedad o el trastorno. Por ejemplo, en el contexto del cáncer, el tratamiento exitoso puede incluir un alivio de los síntomas o la detención de la progresión de la enfermedad, como puede medirse a través de una reducción de la velocidad de crecimiento de un tumor, una detención en el crecimiento del tumor, una reducción en el tamaño de un tumor, una remisión parcial o completa del cáncer, o una mayor velocidad de supervivencia o beneficio clínico.

[0042] En un aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento del

cáncer que incluyen administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula I:



I

una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad administrada del compuesto de fórmula I es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 35 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 70 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de 100 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una

$C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto. Preferiblemente la cantidad administrada del compuesto es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto. Por consiguiente, debe comprenderse que la $C_{\text{máx}}$ provista por la cantidad suficiente de compuesto de fórmula I, tautómeros y sales de los mismos está dentro de los rangos indicados.

[0043] En otro aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener entre aproximadamente 10 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad administrada del compuesto es suficiente para obtener entre aproximadamente 20 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, entre aproximadamente 40 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la

administración, o entre aproximadamente 80 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración.

[0044] Típicamente, en los métodos de tratamiento del cáncer que se describen en la presente documentación, se administra el compuesto de fórmula I, o un tautómero del mismo, como una sal aceptable para uso farmacéutico. Son apropiadas sales tales como lactato, malato, mesilato, acetato, tartrato, fosfato, sulfato, nitrato, HCl, citrato o maleato en varias relaciones molares, y sus formas enantioméricas o racémicas. Preferiblemente, se administra la sal de lactato del compuesto de fórmula I a un sujeto, tal como un sujeto humano. La sal de lactato se dosifica convenientemente al paciente en una píldora, una tableta, una cápsula de gel, una pastilla, una suspensión o una solución acuosa, y se administra por vía oral. En otras realizaciones, el compuesto o la sal puede administrarse por inyección, como se describe más adelante.

[0045] Por consiguiente, en algunas realizaciones de los presentes métodos de tratamiento del cáncer, se administra el compuesto de fórmula I como una composición farmacéutica o un medicamento que incluye fructosa. Dichas composiciones también pueden incluir un agente saborizante, tal como sabor de mandarina tetarome o semejantes, y/o un diluyente, tal como agua. Por consiguiente, los presentes métodos de tratamiento del cáncer pueden incluir además mezclar el compuesto de fórmula I sólido con agua para formar una mezcla acuosa, antes de administrar el compuesto al sujeto. La invención provee además el uso del compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento del cáncer.

[0046] En algunas realizaciones de los presentes métodos de tratamiento del cáncer, la cantidad del compuesto de fórmula I administrada al sujeto varía

entre 0,25 y 30 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otras realizaciones, la cantidad administrada del compuesto al sujeto varía entre aproximadamente 25 y 1500 mg/sujeto por día, entre aproximadamente 100 y 1000 mg/sujeto por día, o entre aproximadamente 200 y 500 mg/sujeto por día.

[0047] Los presentes métodos de tratamiento del cáncer son efectivos contra una amplia variedad de cánceres, incluyendo aquellos donde el cáncer a tratar es un tumor sólido o una leucemia. En particular, los presentes métodos pueden usarse para tratar cánceres tales como cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, carcinoma de células pequeñas, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedades mielo-proliferativas, cáncer de células pulmonares no pequeñas, cáncer de células pulmonares pequeñas, leucemia linfocítica crónica, sarcoma, melanoma, linfoma, cáncer de tiroides, cáncer neuroendocrino, cáncer de células renales, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal del estroma, glioma, cáncer de cerebro o cáncer de vejiga. Si bien no se desea depender de una teoría determinada, se cree que los presentes métodos de tratamiento del cáncer son efectivos contra tumores sólidos debido a que el compuesto de fórmula I actúa como inhibidor de la angiogénesis. Más específicamente, se cree que el compuesto de fórmula I y sus metabolitos activos inhiben selectivamente determinadas tirosina quinasas receptoras que participan en la angiogénesis tumoral y en leucemias.

[0048] En algunas realizaciones, los presentes métodos de tratamiento del cáncer incluyen además administrar el compuesto de fórmula I como parte de un ciclo de tratamiento. Un ciclo de tratamiento incluye una fase de administración, durante la cual se administra el compuesto al sujeto con una

base regular, y un descanso, durante el cual no se administra el compuesto. Por ejemplo, el ciclo de tratamiento puede comprender administrar la cantidad de compuesto de fórmula I diariamente por 7, 14, 21 ó 28 días, seguidos por 7 ó 14 días sin administrar el compuesto. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento comprende administrar la cantidad de compuesto diariamente por 7 días, seguidos por 7 días sin administrar el compuesto. Puede repetirse un ciclo de tratamiento una o más veces para obtener un curso de tratamiento. Además, puede administrarse el compuesto una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces por día durante la fase de administración del ciclo de tratamiento. En otras realizaciones, los métodos comprenden además administrar la cantidad de compuesto una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces por día, o día por medio, durante un curso de tratamiento. Un curso de tratamiento se refiere a un período de tiempo durante el cual se somete al sujeto a un tratamiento para el cáncer que emplea los presentes métodos. Por consiguiente, un curso de tratamiento puede extenderse por uno o más ciclos de tratamiento, o puede referirse al período de tiempo durante el cual el sujeto recibe en forma diaria o intermitente dosis del compuesto de fórmula I.

[0049] Se proveen además métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener una AUC de entre aproximadamente 500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 750 y 120000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En otra de dichas realizaciones, la cantidad administrada del compuesto es suficiente para

obtener una AUC de entre aproximadamente 1000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 1500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto. En otra de dichas realizaciones, la AUC es de entre aproximadamente 2000 y 15000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 3000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0050] En otro aspecto de la invención, se provee el uso de un compuesto de fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer, en una forma de dosificación unitaria, donde cada dosis unitaria del medicamento es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto,
- (b) entre aproximadamente 10 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración al sujeto, o
- (c) una AUC de entre aproximadamente 500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 750 y 120000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto.

[0051] En algunas realizaciones del uso de un compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer, cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,
- (b) entre aproximadamente 20 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o
- (c) una AUC de entre aproximadamente 1000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 1500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0052] En otras realizaciones, cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 50 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 100 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,
- (b) entre aproximadamente 40 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o
- (c) una AUC de entre aproximadamente 2000 y 15000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 3000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0053] En aún otras realizaciones, cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el

plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, o

(b) entre aproximadamente 40 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración.

[0054] En otra realización, cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto; o una $C_{\text{máx}}$ de entre 100 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0055] Típicamente, en los usos del compuesto de fórmula I que se describen en la presente documentación, se usa la sal de lactato del compuesto para preparar el medicamento. Dichos medicamentos son apropiados para una administración oral. La forma de dosificación unitaria del medicamento incluye, sin limitaciones, una píldora, una cápsula, una tableta, una cápsula de gel, una pastilla, una suspensión o una solución acuosa. Además, el medicamento es adecuado para una administración por inyección como un bolo pequeño, una infusión lenta o una infusión a largo plazo.

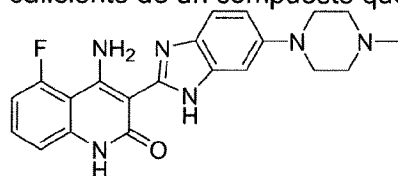
[0056] Los compuestos de fórmula I, formula II y formula III pueden estar acompañados por instrucciones que describan cualquiera de los métodos de la invención. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención provee al menos un compuesto de fórmula I, formula II y/o formula III en combinación con instrucciones para usarlo en un método de tratamiento del cáncer o para

analizar el perfil metabólico del compuesto de fórmula I.

[0057] La presente invención provee además métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, donde la cantidad de compuesto administrada en un primer ciclo de tratamiento es de 25 mg por día, y se incrementa la cantidad de compuesto administrada con cada ciclo de tratamiento subsiguiente hasta que se administran 1500 mg de compuesto por día o se observa una toxicidad limitante de la dosis en el sujeto. Típicamente en dichos métodos, la cantidad de compuesto administrada se duplica con cada ciclo de tratamiento subsiguiente posterior al primero. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento comprende administrar la misma cantidad de compuesto diariamente por 7 días, seguidos por 7 días sin administrar el compuesto.

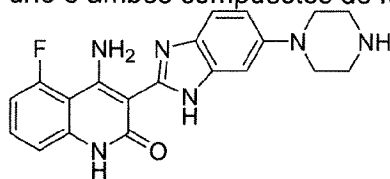
[0058] Del mismo modo, en algunas realizaciones del uso de un compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento, como se describe en la presente documentación, cada dosis unitaria del medicamento incluye entre 0,25 y 30 mg/kg del compuesto, el tautómero y/o las sales, sobre la base del peso corporal del sujeto. Además, cada dosis unitaria del medicamento puede incluir una cantidad del compuesto, el tautómero y/o las sales que varía entre 25 y 1500 mg. El medicamento puede colocarse en un equipo que comprende una cantidad de 7, 14, 21 ó 28 de dichas unidades de dosificación diarias, donde el equipo es apropiado para usar en un ciclo de tratamiento que comprende administrar dicha cantidad diaria de compuesto en cada uno de los 7, 14, 21 ó 28 días, seguidos por 7 ó 14 días sin administrar el compuesto.

[0059] En otro aspecto, la invención provee métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad suficiente de un compuesto que tiene la fórmula I

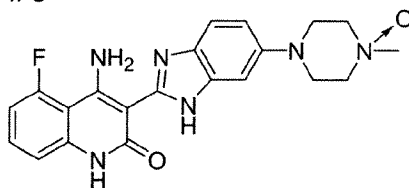


I

una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, y exponer al sujeto a uno o ambos compuestos de fórmula II y fórmula III seleccionados entre:



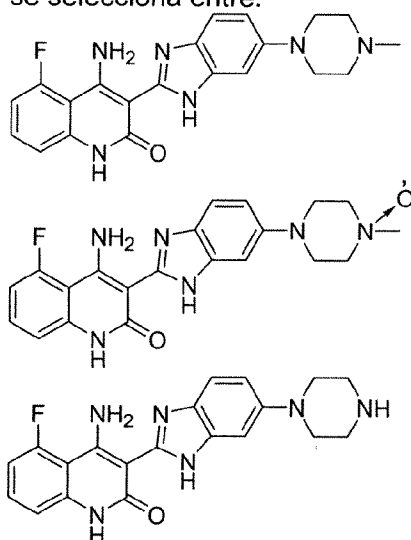
II o



III,

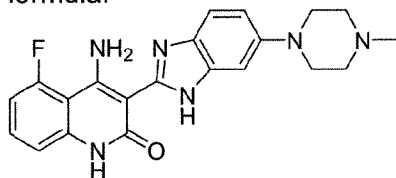
donde uno o ambos de los compuestos de fórmula II y fórmula III son producidos por el metabolismo del compuesto de fórmula I en el sujeto, para obtener una $C_{\text{máx}}$ combinada para uno o más de los compuestos de fórmula I, fórmula II y fórmula III que varía entre aproximadamente 20 y aproximadamente 4000 ng/ml en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ combinada para uno o más de los compuestos de fórmula I, fórmula II y fórmula III que varía entre aproximadamente 40 y aproximadamente 8000 ng/ml en la sangre del sujeto.

[0060] En aún otro aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento del cáncer que comprenden exponer a un sujeto que tiene cáncer a una cantidad suficiente de uno o más compuestos que tienen una fórmula que se selecciona entre:

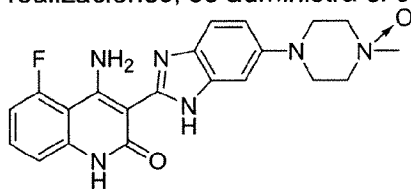


un metabolito activo del mismo, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para obtener una $C_{\text{máx}}$ combinada de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml de uno o más compuestos en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ combinada de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml de uno o más compuestos en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más compuestos provee una $C_{\text{máx}}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 35 y 2600 ng/ml en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 35 y 6000 ng/ml en la sangre del sujeto. En otras realizaciones, la cantidad de uno o más compuestos provee una $C_{\text{máx}}$ para uno de los compuestos de entre aproximadamente 35 y 1200 ng/ml en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ para

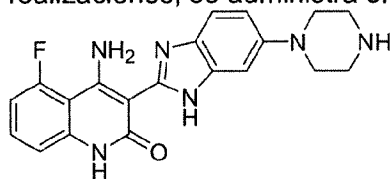
uno de los compuestos de entre aproximadamente 50 y 2400 ng/ml en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, se administra el compuesto de fórmula:



una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, al sujeto. En otras realizaciones, se administra el compuesto de fórmula:



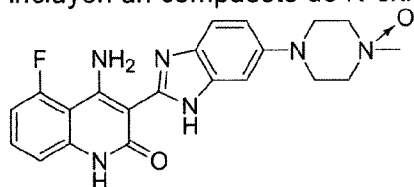
una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, al sujeto. En aún otras realizaciones, se administra el compuesto de fórmula:



una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, al sujeto.

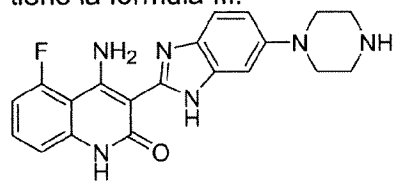
[0061] Para determinar la seguridad y/o la eficacia de un compuesto de fórmula I sobre una enfermedad particular, es importante poder monitorear la farmacocinética y la farmacodinámica del compuesto en un sujeto después de la administración del compuesto. Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proveen métodos para determinar un perfil metabólico para un

compuesto de fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto. El método incluye medir la cantidad de al menos un metabolito del compuesto en una o más muestras de orina, sangre o tejido tomadas del sujeto. Los metabolitos que pueden medirse empleando el método incluyen un compuesto de N-óxido que tiene la fórmula II:



II

también conocido como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-4-oxidopiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, y el compuesto de N-desmetilo que tiene la fórmula III:



III

también conocido como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En algunos de dichos métodos para determinar el perfil metabólico de un compuesto de fórmula I, los métodos incluyen medir la cantidad del metabolito de fórmula II y el metabolito de fórmula III. Pueden medirse las cantidades de metabolitos usando procedimientos bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica, incluyendo espectroscopía ultravioleta (UV) y/o cromatografía líquida-espectroscopía de masa (LC-MS).

[0062] En otros aspectos de la invención, se proveen métodos para determinar

la cantidad de un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto. Los métodos incluyen medir la cantidad del compuesto en una muestra de orina, sangre o tejido tomada del sujeto después de administrársele el compuesto. Este método puede incluir además medir la cantidad de un metabolito del compuesto en la muestra. Los metabolitos que pueden medirse incluyen, sin limitaciones, el compuesto de N-óxido de fórmula II y/o el compuesto de N-desmetilo de fórmula III. En algunas realizaciones, el método incluye además tomar dos o más muestras del sujeto en distintos momentos después de administrar el compuesto de fórmula I al sujeto.

[0063] En otro aspecto, se provee el compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para usar en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar una cantidad de dicho compuesto a un paciente con cáncer, en una cantidad suficiente para proveer al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto,
- (b) entre aproximadamente 10 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración al sujeto, o
- (c) una AUC de entre aproximadamente 500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en

el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 750 y 120000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto.

[0064] En algunas realizaciones del compuesto para usar en un método de tratamiento del cáncer, cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,
- (b) entre aproximadamente 20 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o
- (c) una AUC de entre aproximadamente 1000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 1500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0065] En otras realizaciones del compuesto para usar en un método de tratamiento del cáncer, cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,
- (b) entre aproximadamente 40 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o

(c) una AUC de entre aproximadamente 2000 y 15000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 3000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

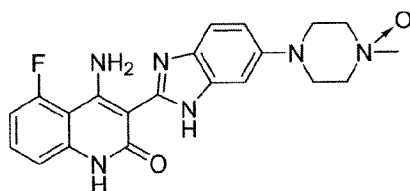
[0066] En aún otras realizaciones del compuesto para usar en un método de tratamiento del cáncer, cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

(a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, o

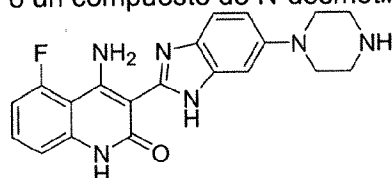
(b) entre aproximadamente 40 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración.

En aún otras realizaciones, cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto; o cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de 100 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

[0067] Se provee además el uso de un metabolito para determinar un perfil metabólico para un compuesto que tiene la fórmula I, una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto, donde el metabolito comprende al menos uno entre un compuesto de N-óxido de fórmula:



o un compuesto de N-desmetilo de fórmula:



[0068] La presente invención también provee composiciones que pueden prepararse mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros de los mismos aceptables para uso farmacéutico, con vehículos, excipientes, aglutinantes o diluyentes aceptables para uso farmacéutico, o semejantes, para tratar o mejorar una variedad de trastornos. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen, sin limitaciones, cáncer, incluyendo cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, carcinoma de células pequeñas, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedades mielo-proliferativas, cáncer de células pulmonares no pequeñas, cáncer de células pulmonares pequeñas, leucemia linfocítica crónica, sarcoma, melanoma, linfoma, cáncer de tiroides, cáncer neuroendocrino, cáncer de células renales, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal del estroma, glioma, cáncer de cerebro o cáncer de vejiga. Una dosis efectiva para el uso terapéutico se refiere a aquella cantidad de uno o más compuestos de la presente invención suficiente para obtener un mejoramiento de los síntomas del trastorno. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse empleando métodos bien conocidos en la técnica, tales como procesos convencionales de granulación, mezcla,

disolución, encapsulación, liofilización, emulsificación o levigación, entre otros. Las composiciones pueden tomar la forma, por ejemplo, de gránulos, polvos, tabletas, cápsulas, jarabes, supositorios, inyecciones, emulsiones, elíxires, suspensiones o soluciones. Las presentes composiciones pueden formularse para varias rutas de administración, por ejemplo, administración oral, administración intranasal, administración transmucósica, administración rectal o administración subcutánea, así como inyección intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intraocular o intraventricular. Puede administrarse también el compuesto o los compuestos de la presente invención de una forma local, en vez de sistémica, tal como por inyección, como una formulación de liberación sostenida. Se proporcionan las siguientes formas de dosificación a modo de ejemplo, y no debería tomárselas como limitantes de la presente invención.

[0069] Para una administración oral, bucal y sublingual, los polvos, las suspensiones, los gránulos, las tabletas, las píldoras, las cápsulas, las cápsulas de gel y las pastillas son formas de dosificación sólidas aceptables. Éstas pueden prepararse, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros de los mismos aceptables para uso farmacéutico, con al menos un aditivo o excipiente, tal como un almidón u otro aditivo. Los aditivos excipientes apropiados son fructosa, sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, sorbitol, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábiga, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, polímeros o glicéridos sintéticos o semi-sintéticos, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, y/o polivinilpirrolidona. Opcionalmente, las formas de dosificación oral pueden

contener ingredientes para contribuir en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes, tales como estearato de magnesio, o preservadores, tales como paraben o ácido sórbico, o antioxidantes, tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, agentes desintegradores, aglutinantes, espesadores, amortiguadores, edulcorantes, agentes saborizantes o agentes odorizantes. Adicionalmente, pueden agregarse colorantes o pigmentos con fines de identificación. Las tabletas y las píldoras pueden tratarse además con materiales de recubrimiento apropiados conocidos en la técnica.

[0070] Las formas de administración líquidas para administración oral pueden tomar la forma de emulsiones, jarabes, elíxires, suspensiones, pastas y soluciones aceptables para uso farmacéutico, las cuales pueden contener un diluyente inactivo, tal como agua. Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse como suspensiones o soluciones usando un líquido estéril, tal como, sin limitaciones, un aceite, agua, un alcohol y combinaciones de éstos. Para una administración oral o parenteral, pueden agregarse agentes tensioactivos, agentes de suspensión y agentes emulsificantes aceptables para uso farmacéutico.

[0071] Como se indicó previamente, las suspensiones pueden incluir aceites. Dichos aceites incluyen, sin limitaciones, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón y aceite de oliva. La preparación en suspensión puede contener también ésteres de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como, sin limitaciones, etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. Pueden usarse también éteres, tales como, sin

limitaciones, poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo, tales como aceite mineral y petrolato; y agua, en las formulaciones en suspensión.

[0072] Para una administración intranasal (por ejemplo, para administrar los compuestos al cerebro), o para una administración por inhalación (por ejemplo, para administrar los compuestos a través de los pulmones), las formulaciones farmacéuticas pueden tomar la forma de una solución, un rocío, un polvo seco o un aerosol que contenga cualquier solvente apropiado, y opcionalmente otros compuestos tales como, sin limitaciones, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores del pH, agentes tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos. Pueden hallarse ejemplos de formulaciones intranasales y métodos de administración en WO 01/41782, WO 00/33813, WO 91/97947, Patente de los EEUU N° 6180603 y Patente de los EEUU N° 5624898. Un propelente para una formulación en aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono o un solvente basado en hidrocarburos de bajo punto de fusión. El compuesto o los compuestos de la presente invención se administran convenientemente bajo la forma de una presentación de rocío en aerosol, desde un nebulizador o un dispositivo semejante.

[0073] Las formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones oleosas que pueden prepararse usando un agente dispersante o humectante adecuado, y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en una fase en solución o pueden tomar la forma de una suspensión, la cual se prepara con un solvente o diluyente. Los solventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. Como alternativa, pueden emplearse

aceites estériles como solventes o agentes de suspensión. Preferiblemente, el aceite o el ácido graso no es volátil, y puede incluir aceites naturales o sintéticos, mono, di o triglicéridos.

[0074] Para una administración por inyección, la formulación farmacéutica puede ser un polvo adecuado para reconstituirse con una solución apropiada, como se describió previamente. Los ejemplos de éstos incluyen, sin limitaciones, polvos secados por congelación, secados por rotación o secados a chorro, polvos amorfos, gránulos, precipitados o particulados. Para una administración por inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, agentes tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos. Los compuestos pueden formularse para una administración parenteral por inyección, tal como por inyección en bolo o infusión continua. Una dosificación unitaria para inyección puede tomar la forma de ampollas o recipientes de dosis múltiples.

[0075] Por consiguiente, en los presentes métodos de tratamiento del cáncer descritos en la presente documentación, puede administrarse el compuesto por inyección como un bolo pequeño, una infusión lenta o una infusión a largo plazo. La inyección puede administrarse una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces por día. Los bolos pequeños se administran generalmente durante un período de entre aproximadamente 1 y 30 minutos; las infusiones lentas se administran generalmente durante un período de entre aproximadamente 30 minutos y 6 horas; y las infusiones a largo plazo se administran generalmente durante un período de entre más de 6 horas y aproximadamente siete días.

[0076] Para una administración rectal, las formulaciones farmacéuticas pueden

tomar la forma de un supositorio, un ungüento, un enema, una tableta o una crema, con el fin de liberar el compuesto en los intestinos, el pliegue sigmoide y/o el recto. Los supositorios rectales se preparan mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros de los compuestos aceptables para uso farmacéutico, con vehículos aceptables, por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicol, los cuales están presentes en una fase sólida a temperaturas normales de almacenamiento, y están presentes en una fase líquida a aquellas temperaturas apropiadas para liberar la droga dentro del cuerpo, tal como en el recto. También pueden emplearse aceites en la preparación de formulaciones del tipo de las cápsulas blandas de gelatina y los supositorios. Puede emplearse agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, y glicerol, en la preparación de las formulaciones en suspensión, las cuales pueden contener también agentes de suspensión, tales como pectinas, carbómeros, metil celulosa, hidroxipropil celulosa o carboximetil celulosa, así como amortiguadores y preservadores.

[0077] Además de aquellas formas de dosificación representativas descritas previamente, existen excipientes y vehículos aceptables para uso farmacéutico generalmente conocidos por aquellos entrenados en la técnica, los cuales se incluyen en la presente invención. Dichos excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991), que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia.

[0078] Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para que sean de acción breve, de liberación rápida y de liberación sostenida, como se describe más adelante. Por consiguiente, las formulaciones farmacéuticas pueden

formularse también para liberación controlada o liberación lenta.

[0079] Las presentes composiciones también pueden comprender, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación extendida para proporcionar un efecto de almacenamiento y/o liberación prolongada. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas pueden comprimirse en pellets o cilindros, e implantarse por vía intramuscular o subcutánea como inyecciones de depósito o como implantes, tales como stents. Dichos implantes pueden emplear materiales inertes conocidos, tales como siliconas y polímeros biodegradables.

[0080] Una dosis efectiva para el uso terapéutico se refiere a aquella cantidad del compuesto que resulta en el mejoramiento de los síntomas. Pueden ajustarse las dosificaciones específicas dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso corporal, las condiciones generales de salud, el sexo, la dieta del sujeto, los intervalos de dosificación, las rutas de administración, la velocidad de excreción y las combinaciones de drogas. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contiene cantidades efectivas está dentro del alcance de la experimentación de rutina y, por ende, queda dentro del alcance de la presente invención. Una dosis efectiva para el uso terapéutico puede variar dependiendo de la ruta de administración y la forma de dosificación. El compuesto o los compuestos preferidos de la presente invención se hallan en una formulación que muestra un índice terapéutico elevado. El índice terapéutico es la relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos, que puede expresarse como la relación entre LD_{50} y ED_{50} . La LD_{50} es la dosis letal para 50% de la población, y la ED_{50} es la dosis efectiva para el uso terapéutico en 50% de la población. La LD_{50} y la ED_{50}

se determinan a través de procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células animales o en animales experimentales.

[0081] La presente invención también provee métodos para mejorar la actividad anti-cáncer en un humano o en un animal no humano. Los métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de un compuesto o una composición de la presente invención a dicho mamífero o animal no humano. Las cantidades efectivas de los compuestos de la presente invención incluyen aquellas cantidades que inhiben RTK, lo que puede detectarse, por ejemplo, empleando un ensayo que se describe en la presente documentación, o cualquier otro ensayo conocido por aquellos entrenados en la técnica que pueda detectar la transducción de señales, en una vía bioquímica, a través de la activación de receptores unidos a proteínas G, por ejemplo, midiendo un nivel elevado de AMPc en comparación con un modelo control. Las cantidades efectivas también pueden incluir aquellas cantidades que alivian los síntomas de un trastorno de RTK que puede tratarse mediante la inhibición de RTK.

[0082] Un trastorno de RTK, o una enfermedad mediada por RTK, que puede tratarse empleando los métodos provistos, incluye cualquier trastorno biológico o enfermedad donde está implicada RTK, o donde la inhibición de RTK potencia una vía bioquímica que alivia el trastorno o el estado de enfermedad. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen cánceres, tales como cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, carcinoma de células pequeñas, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica o enfermedades mielo-proliferativas.

[0083] Se ha descrito la síntesis del compuesto **1** en la Patente de los EEUU N° 6605617. Para confirmar las identidades de los compuestos **2** y **3**, se

sintetizaron metabolitos del compuesto **1** y los compuestos **2** y **3** en forma independiente, como se indica en el Ejemplo 6.

[0084] La presente invención, descrita en forma general como se lo ha hecho, podrá comprenderse más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

[0085] Se usan las siguientes abreviaturas y términos en los Ejemplos:

ATP:	Trifosfato de adenosina
AUC:	Área debajo de la curva
BSA:	Albúmina de suero bovino
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EDTA:	Ácido etilendiamino tetraacético
ERK:	Quinasa regulada extracelular
Hepes:	N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(ácido 2-etansulfónico)
HPLC:	Cromatografía líquida de alto desempeño
HMVEC:	Células endoteliales microvasculares humanas
kg:	Kilogramo
LC:	Cromatografía líquida
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno
MS:	Espectroscopía de masa
MeOH:	Metanol
mg:	Miligramo
mL:	Mililitro
MTS:	[3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-

sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna

nM:	Nanomolar
PBS:	Solución salina amortiguada con fosfato
NMR:	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SCF:	Factor de células madre
TFA:	Ácido trifluoroacético
$T_{1/2}$:	Vida media – el tiempo requerido para la eliminación de 50% de un compuesto en un sistema biológico
μg :	Microgramo(s)
μL :	Microlitro(s)
μM :	Micromolar
UV:	Espectroscopía ultravioleta

Ejemplo 1

[0086] Se evaluaron los efectos antiproliferativos de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto **1**) contra una gran cantidad de líneas de células cancerosas y líneas de células primarias no malignas. Los métodos fueron como se indica a continuación: se plaquearon las células en placas de 96 cavidades; después de entre tres y cinco horas de tiempo de gelificación para las líneas de células adherentes, se agregaron dosis de los compuestos; tres días más tarde, se determinaron cuáles células eran viables agregando una solución MTS (Promega). Se midió la absorbancia a 490 nm y se calcularon los valores de EC_{50} usando una regresión no lineal. Para el ensayo de HMVEC, se incubaron los compuestos

con las células por tres días en presencia de cinco ng/ml de VEGF recombinante. Para el ensayo de SCF/c-KIT, se incubaron las células TF-1 y H526 por tres días en presencia de 40 ng/ml y 100 ng/ml de SCF recombinante, respectivamente. Se evaluó la proliferación agregando una solución MTS y midiendo la absorbancia a 490 nm. Se calcularon las EC_{50} por regresión no lineal. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

[0087] En un subconjunto de las líneas de células cancerosas y células endoteliales, la proliferación fue inhibida con EC_{50} 50 nM, lo que es consistente con su dependencia de una RTK que es blanco del compuesto **1** (MV4; 11: expresión de FLT3 activo en forma constitutiva; HMVEC: proliferación mediada por VEGFR2; TF-1: proliferación mediada por c-KIT), con la excepción de la línea celular KM12L4a. Aunque esta línea celular no expresa algunas de las RTK blanco (por ejemplo, VEGFR $\frac{1}{2}$ y PDGFR, determinado por RT-PCR), los experimentos mostraron que la inhibición de estas RTK individuales no explica por completo los efectos antiproliferativos potentes observados con el compuesto **1**. Este hallazgo sugiere que la inhibición de varias RTK, o algún efecto aún no identificado, puede ser la causa del efecto antiproliferativo mediado por el compuesto **1** en esta línea celular.

[0088] La mayoría de las líneas celulares mostró una respuesta antiproliferativa cuando se las incubó con el compuesto **1**, con EC_{50} de entre 1 y 10 μ M, incluyendo dos líneas celulares primarias HMEC (células epiteliales mamarias humanas normales) y PREC (células epiteliales prostáticas humanas normales). Consistente con los resultados *in vitro*, el crecimiento de xenoinjertos KM12L4a y MV4;11 en ratones fue inhibido en forma potente por el compuesto **1** *in vivo*.

Tabla 1

EC ₅₀ 50 nM	EC ₅₀ 0,4- 1µM	EC ₅₀ 1-10 µM	EC ₅₀ > 10 µM
MV4; 11 (AML) KM12L4a (cáncer de colon) HMVEC (endotelio mediado por VEGF/VEGF R2) TF-1 (AML mediada por SCF/c-KIT)	RS4 (ALL) 4T1 (cáncer de mama en ratón)	MDA-MB435 (cáncer de mama) SKOV3 (cáncer de ovario) K562 (CML) Ku812 (CML) MOLT-4 (ALL) ARH77 (mieloma múltiple) HCT116 (cáncer de colon) Du145 (cáncer de próstata) PC3 (cáncer de próstata) H209 (cáncer de pulmón) H226 (cáncer de pulmón) HT29 (cáncer de colon) SW620 (cáncer de colon) PrC (epitelio prostático normal) HMEC (epitelio	U87 (cáncer de cerebro)

		prostático normal)	
--	--	--------------------	--

^atodas las líneas celulares evaluadas fueron de origen humano, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 2

[0089] Se identificaron dos metabolitos del compuesto **1** y se los caracterizó parcialmente en plasma recolectado de ratas en un estudio de toxicología de 2 semanas. El día 1 y el día 14, se analizaron los plasmas de los animales dosificados por UV y LC/MS, en grupos con dosificaciones diarias de 30 u 80 mg/kg, PO. Los metabolitos identificados fueron el compuesto de N-óxido de piperazina de fórmula II (compuesto **2**) y el compuesto N-demetilado de fórmula III (compuesto **3**) (véase el Ejemplo 6 para hallar la síntesis y caracterización de estos compuestos). Se proporcionan los niveles estimados de los metabolitos (sobre la base de la absorbancia UV y en comparación con niveles conocidos de compuesto **1**, cuantificados en las mismas muestras que los análisis previos) en la Tabla 2. Se halló que el metabolito de N-desmetilo presentaba una abundancia sustancialmente menor que el compuesto **1** en todas las muestras de plasmas recolectadas después de la dosificación. Se observó que el metabolito de N-óxido estaba presente con una abundancia menor que el compuesto **1**, excepto a las 24 horas del día 14 en el grupo con la dosis de 80 mg/kg y a la 1-2 horas del día 1 en el grupo con la dosis de 30 mg/kg (Tabla 2). El perfil metabólico no cambia con la dosis o la duración de la dosis. En general, los niveles del metabolito aumentan en tandem con los niveles de compuesto **1** al escalar la dosis.

[0090] En ambos grupos, la duración de la dosis, día 1 versus día 14, no parece resultar en un incremento en los niveles de los metabolitos solos en plasma

(Tabla 2) o en comparación con los niveles de compuesto **1**. Los niveles de compuesto **1** disminuyen con la duración de la dosis, y esto es reflejado por una disminución concomitante en los niveles de metabolito. Esto sugiere que la reducción dependiente del tiempo en la exposición del compuesto **1** no se ve reflejada en un metabolismo incrementado. El día 14, las muestras de 24 horas contenían el compuesto **1** y sus metabolitos a menores niveles que las muestras de 24 horas del día 1, lo que indica que no hubo acumulación de metabolitos o compuesto **1** con un régimen de una dosificación diaria de 30 u 80 mg/kg. El metabolito de N-óxido está presente con una mayor abundancia que el metabolito de N-desmetilo en todos los puntos de tiempo ensayados en el grupo con una dosis de 80 mg/kg, y en todos menos el punto de tiempo de 24 horas posterior al día 1 en el grupo con una dosis de 30 mg/kg. Los niveles de metabolito de N-desmetilo parecen descender más lentamente que aquellos del compuesto **1**, lo que sugiere una mayor $T_{1/2}$ e indica que los niveles en plasma de este metabolito son probablemente determinados por su velocidad de eliminación, y no su velocidad de formación, como es probablemente el caso, en contraste, para el N-óxido.

Tabla 2: Niveles de compuesto **1** y niveles estimados de metabolitos del compuesto **1** en plasma de rata

Dosis (mg/kg)	Día	Tiempo de muestra (horas)	Des-CH ₃ (ng/ml) ¹	N-óxido (ng/ml) ¹	Compuesto 1 (ng/ml) ²
30	1	0	0	0	0
30	1	1-2	14	1090	635
30	1	4-8	48	310	943
30	1	24	22	25	54

30	14	0	6	1.3	20
30	14	1-2	6	135	467
30	14	4-8	12	220	442
30	14	24	4	0.4	8
100	1	0	0	0	0
100	1	1-2	35	424	1212
100	1	4-8	84	779	2075
100	1	24	83	137	500
100	14	0	15	67	162
100	14	1-2	17	122	628
100	14	4-8	19	533	1099
100	14	24	10	102	33

1 : Niveles de metabolitos estimados sobre la base de las áreas de absorbancia UV de los metabolitos, en comparación con las áreas UV del compuesto **1** y usando niveles informados previamente del compuesto **1**.

2: Niveles de compuesto **1** cuantificados previamente en un estudio separado de las mismas muestras de plasma analizadas en la presente documentación.

Ejemplo 3

Ensayos in vitro de quinasa para tirosina quinasas receptoras

[0091] Se midió la actividad de quinasa de una cantidad de proteínas tirosina quinasas suministrando ATP y un péptido o una proteína apropiada que contenía un residuo de aminoácido de tirosina para fosforilación, y evaluando la transferencia de la porción de fosfato al residuo de tirosina. Se expresaron proteínas recombinantes que correspondían a los dominios citoplasmáticos de los receptores FLT-1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR α ,

PDGFR β , y FGFR1 en células de insecto Sf9 usando un sistema de expresión en *Baculovirus* (InVitrogen), y se las purificó mediante una interacción con anticuerpos Glu (para construcciones marcadas con epitopes Glu) o por cromatografía de iones metálicos (para construcciones marcadas con His₆ (SEQ ID N° 1)). Para cada ensayo, se diluyeron en forma seriada compuestos de prueba en DMSO y luego se los mezcló con un amortiguador apropiado para reacción de quinasa más ATP. Se agregó proteína quinasa y un sustrato de péptido biotinilado apropiado hasta obtener un volumen final de 50-100 μ l, se incubaron las reacciones por 1-3 horas a temperatura ambiente, y luego se las detuvo agregando 25-50 μ l de EDTA 45 mM, Hepes 50 mM, pH 7,5. La mezcla de reacción detenida (75 μ l) se transfirió a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) y se incubó por 1 hora. El péptido fosforilado producido se midió con el sistema de fluorescencia DELFIA de resolución por tiempo (Wallac o PE Biosciences), usando un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con Europio PT66, con la modificación de que se suplió el amortiguador de ensayo DELFIA con MgCl₂ 1 mM para diluir el anticuerpo. Se leyó la fluorescencia resuelta por tiempo en un fluorómetro Wallac 1232 DELFIA o un lector de señales múltiples PE Victor II. Se calculó la concentración de cada compuesto para una inhibición del 50% (IC₅₀) empleando una regresión no lineal, con un software de análisis de datos XL Fit.

[0092] Se evaluaron las quinasas FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tie-2, y FGFR1 en Hepes 50 mM, pH 7,0, MgCl₂ 2 mM, MnCl₂ 10 mM, NaF 1 mM, DTT 1 mM, 1 mg/ml de BSA, ATP 2 μ M, y 0,20-0,50 μ M del sustrato de péptido biotinilado correspondiente. Se agregaron las quinasas FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2 y FGFR1 a razón de 0,1 μ g/ml, 0,05 μ g/ml o 0,1 μ g/ml,

respectivamente. Para el ensayo de PDGFR quinasa, se usaron 120 $\mu\text{g/ml}$ de enzima con las mismas condiciones de amortiguador que las empleadas previamente, excepto que se cambiaron las concentraciones de ATP y péptido sustrato a ATP 1,4 μM , y péptido sustrato biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID N° 2) 0,25 μM . Cada uno de los compuestos anteriores mostró un valor de IC₅₀ menor que 10 μM respecto de FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, y FGFR1.

[0093] Las tirosina quinasas recombinantes y activas Fyn y Lck están disponibles comercialmente y se adquirieron en Upstate Biotechnology. Para cada ensayo, se diluyeron en forma seriada los compuestos de prueba en DMSO y luego se los mezcló con un amortiguador de reacción de quinasa apropiado más ATP marcado con ³³P gamma 10 mM. Se agregó la proteína quinasa y el sustrato apropiado de péptido biotinilado para obtener un volumen final de 150 μl . Se incubaron las reacciones por 3-4 horas a temperatura ambiente y se las detuvo transfiriéndolas a una placa blanca de microtitulación recubierta con estreptavidina (Thermo Labsystems), que contenía 100 μl de amortiguador de detención de la reacción con EDTA 100 mM y ATP sin marcar 50 μM . Después de 1 hora de incubación, se lavaron las placas de estreptavidina con PBS y se agregaron 200 μl de fluido de centelleo Microscint 20 a cada cavidad. Se sellaron las placas y se las contó usando TopCount. Se calculó la concentración de cada compuesto para obtener una inhibición de 50% (IC₅₀) empleando una regresión no lineal, con el software de análisis de datos XL Fit.

[0094] El amortiguador de reacción de quinasas para Fyn, Lck y c-ABL contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 15 mM, MnCl₂ 30 mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM,

beta-glicerol fosfato 25 mM, 0,01% de BSA/PBS, 0,5 μ M del sustrato peptídico apropiado (sustrato de péptido Src biotinilado: biotina-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH₂ (SEQ ID N° 3) para Fyn y Lck), ATP sin marcar 1 μ M ATP y quinasa 1 nM.

[0095] Se midió la actividad quinasa de c-Kit y FLT-3 suministrando ATP y un péptido o una proteína que contuviera un residuo de un aminoácido de tirosina para fosforilación, y evaluando la transferencia de la porción de fosfato al residuo de tirosina. Se adquirieron proteínas recombinantes que correspondían a los dominios citoplasmáticos de los receptores c-Kit y FLT-3 (Proquinase). Para la evaluación, se diluyó un compuesto ejemplar, por ejemplo 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, en DMSO, y se lo mezcló con amortiguador de reacción de quinasa que se describe más adelante, más ATP. Se agregó la proteína quinasa (c-Kit o FLT-3) y el sustrato de péptido biotinilado (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID N° 2)) hasta obtener un volumen final de 100 μ l. Se incubaron estas reacciones por 2 horas a temperatura ambiente y luego se las detuvo agregando 50 μ l de EDTA 45 mM, HEPES 50 mM, pH 7,5. La mezcla de reacción detenida (75 μ l) se transfirió a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) y se incubó por 1 hora. El péptido fosforilado producido se midió con el sistema de fluorescencia DELFIA de resolución por tiempo (Wallac o PE Biosciences), usando un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con Europio PT66, con la modificación de que se suplió el amortiguador de ensayo DELFIA con MgCl₂ 1 mM para diluir el anticuerpo. Se leyó la fluorescencia resuelta por tiempo en un fluorómetro Wallac 1232 DELFIA o un lector de señales múltiples PE Victor II. Se calculó la

concentración de cada compuesto para una inhibición del 50% (IC_{50}) empleando una regresión no lineal, con un software de análisis de datos XL Fit.

[0096] Se analizaron las quinasas FLT-3 y c-Kit en Hepes 50 mM, pH 7,5, NaF 1 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $MnCl_2$ 10 mM y 1 mg/ml de BSA, ATP 8 μ M y 1 μ M del sustrato de péptido biotinilado correspondiente (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID N° 2)). Se determinó la concentración de quinasas FLT-3 y c-Kit a 2 nM.

Se midieron las IC_{50} para los metabolitos del compuesto 1 y se las indica en la Tabla 3, junto con las IC_{50} del compuesto 1, con fines comparativos.

Tabla 3

Compuesto	IC_{50} (μ M)					
	VEGFR flt	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
Compuesto 1	0,010	0,013	0,008	0,027	0,0001	0,0015
Compuesto 2	0,004	0,009	0,005	0,010	0,0004	0,0002
Compuesto 3	0,019	0,012	0,019	0,037	0,0001	0,0002

Ejemplo 4

[0097] Este estudio con un único agente evaluó la dosificación oral diaria del compuesto 1 en el modelo de tumor de colon humano KM12L4a.

[0098] A ratas hembra Nu/Nu, con una edad de 7-8 semanas (Charles River), se las implantaron 2×10^6 células KM12L4a por vía subcutánea en el flanco derecho. El tratamiento comenzó 7 días después, cuando el volumen tumoral

promedio era de 125 mm³. Esto se denominó día 1 del ensayo. Se formuló el compuesto 1 como una solución en H₃PO₄ 10 mM y se lo administró por vía oral.

[0099] Se incluyeron siete grupos de tratamiento en el estudio, (n = 10/grupo): vehículo (agua) *p.o., q.d.*; y seis grupos de dosis de compuesto 1: 3, 10, 30, 100, 200, 300 mg/kg *p.o., q.d.*

[0100] Se tomaron muestras de plasma de animales satélite en cada grupo de dosificación por varios días para caracterizar la farmacocinética del compuesto 1 en los ratones portadores de tumores (N = 2/punto de tiempo/grupo de dosificación). Se determinaron las concentraciones del compuesto 1 en el tejido y los tumores en muestras tomadas de animales del grupo de dosificación de 100 y 200 mg/kg, 8 y 24 después de la dosificación el día 22 (N = 2/punto de tiempo/grupo de dosificación).

[0101] Se determinaron las concentraciones del compuesto 1 en plasma empleando un ensayo no convalidado de LC/MS/MS, con un rango de calibración de entre 1 y 8000 ng/ml, y un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 ng/ml (Charles River Laboratories, Worcester, MA). Se determinaron también las concentraciones del compuesto 1 en el tejido y los tumores usando un ensayo no convalidado de LC/MS/MS, con un rango de calibración de entre 20 y 43740 ng/g, y un LLOQ de 20 ng/g.

[0102] Se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos compuestos (C_{máx} y AUC) usando un análisis convencional no compartimentalizado de los datos promedio de concentración-tiempo en plasma del compuesto, en cada grupo de dosificación y para cada día de muestreo (WinNonlin Professional, versión 4). Se determinaron los valores informados de AUC usando 3 puntos de datos de

concentración-tiempo. Se informaron los valores de concentración previos a la dosis como aquellos observados inmediatamente antes de la dosificación.

[0103] Se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral dependiente de la dosis para todas las dosificaciones a los 4-7 días de tratamiento (véase la Tabla 4). La ED_{50} calculada fue de 17 mg/kg. Se observaron regresiones tumorales de > 50% del tamaño inicial en la mayoría de los ratones dosificados con el compuesto **1** a razón de 200 y 300 mg/kg. Sin embargo, estas dosis no fueron toleradas durante todo el estudio. Para los días 12-16, los ratones tratados con 300 mg/kg habían perdido 20-30% de peso corporal y fueron sacrificados. En aquellos tratados con 200 mg/kg, se sacrificó 1 de cada 10 el día 14, con 22% de pérdida de peso, y se sacrificaron los ratones restantes los días 21-24, con > 25% de pérdida de peso. Los ratones se dosificaron por 37 días con 100 mg/kg y permanecieron con un 98% del peso inicial; los tumores permanecieron estables a esta dosis (Figura 1). El grupo con vehículo se tomó el día 7 y se calculó la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (Tabla 4).

Tabla 4: Actividad de respuesta a la dosis del Compuesto **1**

Compuesto 1 dosificado diariamente (n = 9- 10/grupo)	Volumen tumoral Día 9 Media \pm SD (mm ³)	Tratado/Control	% de inhibición del crecimiento tumoral	Valor de P versus vehículo
Vehículo	1333 \pm 283	-	-	-
3 mg/kg	1168 \pm 202	0,88	12	0,1519
10 mg/kg	861 \pm 321	0,65	35	0,0037

Compuesto 1 dosificado diariamente (n = 9- 10/grupo)	Volumen tumoral Día 9 Media \pm SD (mm ³)	Tratado/Control	% de inhibición del crecimiento tumoral	Valor de P versus vehículo
30 mg/kg	553 \pm 213	0,42	58	$\leq 0,00001$
100 mg/kg	263 \pm 108	0,20	80	$\leq 0,00001$
200 mg/kg	98 \pm 40	0,07	93	$\leq 0,00001$
300 mg/kg	74 \pm 30	0,06	94	$\leq 0,00001$

[0104] El segundo día de dosificación (día 2), las concentraciones del compuesto 1 en plasma aumentaron proporcionalmente con la dosis (Tabla 5) en todos los grupos de dosificación. Después de una dosificación múltiple por al menos 2 semanas, las concentraciones en plasma eran comparables a aquellas del día 2, lo que sugiere que no hubo acumulación al dosificarse los ratones en forma diaria (Tabla 5). De forma similar, la concentración de compuesto 1 en plasma previa a la dosis obtenida los días 3, 8 y 15 fue similar dentro de cada grupo, lo que sugiere que se alcanzó un estado estable después del día 2. De este modo, estos datos sugieren que el compuesto 1 posee una farmacocinética dependiente de la dosis y el tiempo en los ratones portadores de tumores.

[0105] Se observó una inhibición del crecimiento tumoral de 35-60% con dosis de 10 y 30 mg/kg, respectivamente. La exposición en plasma correspondiente del compuesto 1, determinada a través de los valores de $C_{\text{máx}}$ y AUC, varió entre 163-742 ng/ml y 1420-5540 ng*hr/ml, respectivamente (Figura 2). Los valores correspondientes de concentración en plasma previa a la dosis variaron

entre 2-135 ng/ml.

Tabla 5: Parámetros farmacocinéticos compuestos del compuesto 1 y datos de concentración-tiempo en plasma después de una dosificación oral de una administración diaria de compuesto 1 a ratones portadores de tumores SC KM1214a

Dosis (mg/kg/día)	Día	Parámetros farmacocinéticos compuestos		Concentraciones promedio en plasma (ng/ml)			
		C _{máx} (ng/ml)	AUC (ng*hr/ml) ¹	Tiempo (horas)			
				0*	2	8	24*
3	2	48	420		48,0	12,7	11,1
	8	--	--	1,55			
10	2	163	1420		163	67,3	2,72
	8	--	--	2,37			
	15	--	--	3,95			
	17	--	--		136	65,8	
30	2	742	5540		742	228	8,42
	8	--	--	7,37			
	15	--	--	23,7			
	17	--	--		416	123	
100	2	1560	18500		1560	1050	97,8
	8	--	--	135			
	15	--	--	54,7			
	22	1550	21200		1550	1330	47,7
200	2	2500	47200		2370	2500	1270

Dosis (mg/kg/día)	Día	Parámetros farmacocinéticos compuestos		Concentraciones promedio en plasma (ng/ml)			
		C _{máx} (ng/ml)	AUC (ng*hr/ml) ¹	Tiempo (horas)			
				0*	2	8	24*
300	8	--	--	454			
	15	--	--	434			
	22	1940	3 1600		1940	1400	1050
	2	3450	61300		3450	2900	1950
	8	--	--	911			
	15	--	--	1220			
	18	2980	58400		2440	2250	2980

¹AUC calculada a partir de 3 pares de datos de 3 concentración-tiempo

-- No determinado

*Concentraciones previas a la dosis

[0106] Las concentraciones de compuesto 1 en tejido el día 22 fueron mayores que aquellas en plasma en los grupos con dosis de 100 y 200 mg/kg, para cada uno de los dos momentos de muestreo (8 y 24 horas después de la dosis) (Tabla 6). Las concentraciones de compuesto 1 en cerebro o corazón fueron entre 13 y 34 veces mayores que aquellas en plasma; mientras que las concentraciones en hígado, pulmón y riñón fueron entre 40 y 126 veces mayores que aquellas en plasma 8 ó 24 horas después de la dosis, en estos dos grupos de dosificación. En general, la relación entre las concentraciones en tejido y plasma a las 8 horas fue comparable a aquella a las 24 horas. Además, las concentraciones en tejido a las 24 horas fueron consistentemente menores

que aquellas a las 8 horas. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las concentraciones de compuesto **1** en tejido parecieron declinar en paralelo con la dosis en plasma. Entonces, el compuesto **1** parece estar ampliamente distribuido en los tejidos (incluyendo el cerebro) en comparación con el plasma, pero no se acumula en los tejidos después de una dosificación oral múltiple.

Tabla 6: Concentraciones medias en tejidos, tumores y plasma el día 22 después de una administración oral de una aplicación diaria de 100 ó 200 mg/kg/día de compuesto **1** a ratones portadores de tumores KM12L4a

Dosis (mg/kg)	Tie mpo (horas)	Concentraciones en tejido (ng/g)						Concentración en plasma (ng/ml)
		Cerebro	Corazón	Riñón	Hígado	Pulmón	Tumor	
100	8	1690	24700	83700	10700	87500	48500	1330
	0				0			
	24	675	1630	3900	5080	3170	16900	47.7
200	8	2420	40400	14300	17600	27700	10700	1400
	0			0	0	0	0	
	24	9160	18700	82800	10900	41600	87900	1050
	0							

N = 2/punto de tiempo/grupo de dosificación, excepto en el grupo con una dosis de 200 mg/kg a las 24 horas, donde N = 1

[0107] Las concentraciones de compuesto **1** en los tumores el día 22 fueron

entre 37 y 354 veces mayores que aquellas en plasma para los grupos con dosis de 100 y 200 mg/kg, en cada uno de los dos momentos de muestreo (8 y 24 horas después de la dosis). Sin embargo, las concentraciones en los tumores a las 24 horas fueron solamente entre 17 y 65% menores que aquellas 8 horas después de la dosis en estos grupos, lo que sugiere una velocidad de eliminación algo más baja de en los tumores, en comparación con aquella presente en otros tejidos normales (tales como cerebro, corazón, hígado, pulmón y riñones). Por lo tanto, el compuesto **1** parece distribuirse extensamente en los tumores en comparación con el plasma, pero puede mostrar una retención preferencial en los tumores respecto del plasma o los tejidos normales.

[0108] En resumen, la eficacia y la tolerabilidad del compuesto **1** está relacionada con la dosis, con inhibiciones significativas después de 4 a 7 días de tratamiento. Se observaron regresiones tumorales con dosis de 300 y 200 mg/kg; estas dosis fueron toleradas diariamente por aproximadamente 14 y 21 días, respectivamente. La pérdida de peso fue la señal clínica asociada con toxicidad. Las dosis de 100 mg/kg fueron toleradas por 37 días sin señales clínicas adversas, con una inhibición del crecimiento tumoral de 80% en comparación con el control. La dosis de 30 mg/kg inhibió el crecimiento en un 60%. El compuesto **1** demostró una farmacocinética independiente de la dosis y el tiempo en los ratones portadores de tumores. Los valores de $C_{\text{máx}}$, AUC y C_{min} para el compuesto **1** en plasma asociados con una inhibición del crecimiento tumoral de 35-60% variaron entre 163-742 ng/ml, 1420-5540 ng*hr/ml y 2-135 ng/ml, respectivamente. El compuesto **1** se distribuyó ampliamente entre los tejidos. Sin embargo, no apareció acumularse en los

tejidos después de la aplicación de múltiples dosis orales. Se verificó una tendencia hacia una retención preferencial del compuesto **1** en tumores respecto de otros tejidos después de una dosificación oral.

Ejemplo 5

[0109] Este estudio con un único agente evaluó la dosificación oral intermitente de compuesto **1** en el modelo de tumor de próstata humano PC3.

[0110] A ratones macho SCID, con una edad de 9-10 semanas, se les implantaron 5 millones de células de próstata humana PC3 en el flanco por vía subcutánea. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron 150 mm³. Este momento se denominó día 1 del estudio. El compuesto **1** se formuló como una solución acuosa y se lo administró por dosificación oral.

[0111] Se incluyeron cinco grupos de tratamiento en el estudio, (n = 10/grupo): Vehículo (agua) *p.o.*, *q.d.*; y cuatro grupos de dosis de compuesto **1** de 100 mg/kg *q.d.*, *q.2.d.*, *q.3.d.*, *q.4.d.*

[0112] Como se muestra en la Tabla 7, se observaron resultados significativos y similares de inhibición tumoral en todos los grupos de tratamiento. El estudio se suspendió para el grupo de dosificación diaria el día 11. El estudio se terminó el día 25 para los grupos restantes, y se midió el volumen tumoral promedio para compararlo con aquél de los grupos tratados con vehículo. Como indicación clínica de la toxicidad, se midió el porcentaje de pérdida de peso en cada grupo.

Tabla 7

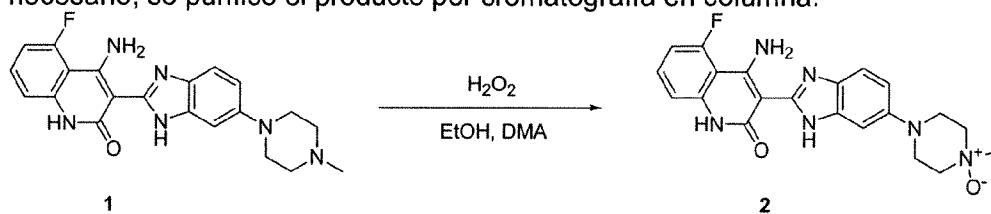
Grupo	n	Dosis totales de compuest	Volumen tumoral promedio el	% de TGI versus vehículo	% promedio de pérdida de peso
-------	---	---------------------------------	-----------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

		o 1	día 25		(rango)
Vehículo	10		2011		13 (1-24%)
100 mpk q d, días 1-11	8	11	790	60%	12 (3-35%)
100 mpk q 2 días	10	13	507	75%	4 (0-13%)
100 mpk q 3 días	10	9	645	68%	4 (0-11%)
100 mpk q 4 días	9	7	686	66%	10 (5-17%)

Ejemplo 6

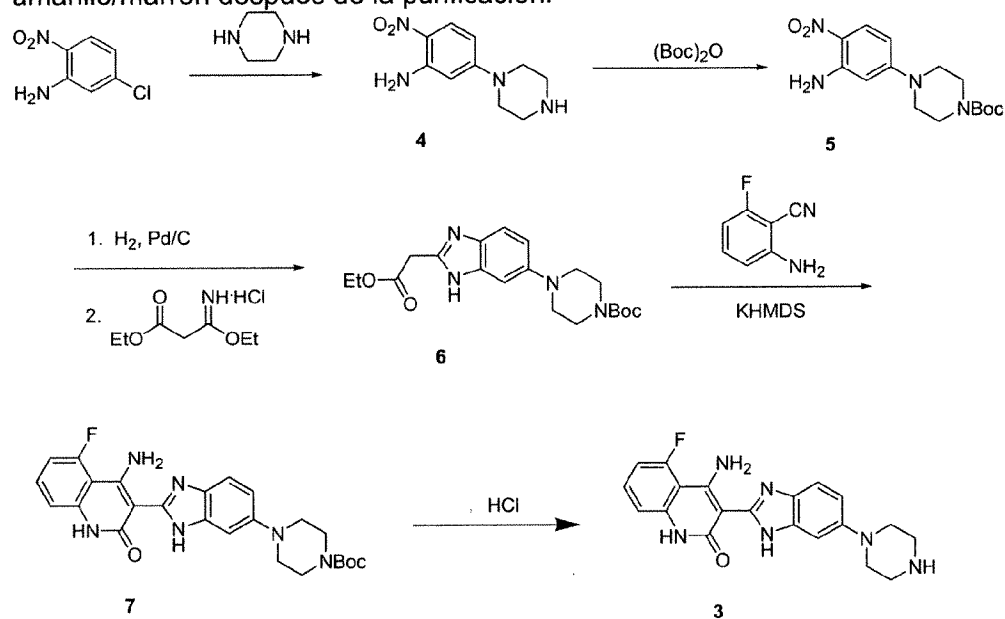
[0113] Para confirmar las estructuras de los metabolitos del compuesto **1** identificados, se sintetizaron los metabolitos en forma independiente.

[0114] El compuesto **2**, el metabolito de N-óxido del compuesto **1**, se sintetizó como se indica en el siguiente esquema. Se calentó el compuesto **1** en una mezcla de etanol, dimetilacetamida y peróxido de hidrógeno. Al completarse la reacción, se aisló el compuesto **2** por filtración y se lavó con etanol. Cuando fue necesario, se purificó el producto por cromatografía en columna.



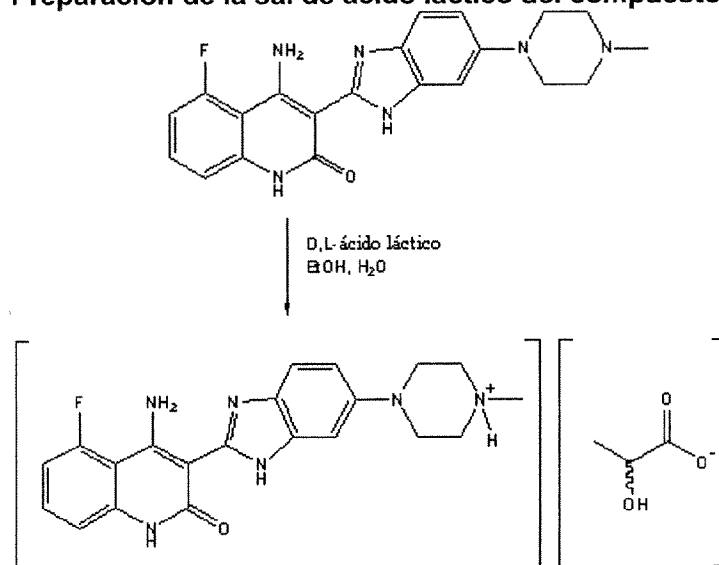
El compuesto **3**, el metabolito de N-desmetilo de compuesto **1**, se sintetizó como se indica en el siguiente esquema. Se trató 5-cloro-2-nitroanilina con piperazina para obtener **4**, que se protegió subsiguientemente con un grupo butiloxicarbonilo (Boc) para obtener **5**. La reducción del grupo nitro, seguida por una condensación con etil éster de ácido 3-etoxi-3-iminopropiónico, dio como resultado **6**. La condensación de **6** con 6-fluoroantranilonitrilo, usando hexametildisilazida de potasio como base, dio como resultado **7**. Se trató **7**

crudo con HCl acuoso para obtener el metabolito deseado como un sólido amarillo/marrón después de la purificación.



Ejemplo 7

Preparación de la sal de ácido láctico del compuesto 1



[0115] Se equipó un frasco de 4 cuellos carenado de 3000 ml con un

condensador, una sonda de temperatura, una entrada de N₂ gaseoso y un agitador mecánico. Se purgó el recipiente de reacción con N₂ por al menos 15 minutos, y luego se lo cargó con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 g, 1,23 mol). Se preparó una solución de D,L- ácido láctico (243,3 g, 1,72 mol de monómero-véase el párrafo siguiente), agua (339 ml) y etanol (1211 ml), y luego se la cargó en el frasco de reacción. Se inició la agitación a una velocidad media, y se calentó la reacción hasta obtener una temperatura interna de 68-72°C. Se mantuvo la temperatura interna de la reacción a 68-72°C por 15-45 minutos, y luego se interrumpió el calentamiento. Se filtró la mezcla resultante a través de una frita de 10-20 micrones, que recolectó el filtrado en un frasco de 12 l. El frasco de 12 l se equipó con una sonda de temperatura interna, un condensador de reflujo, un embudo adicional, una entrada y una salida de gas, y un agitador en la parte superior. Se agitó luego el filtrado a velocidad media y se calentó a reflujo (temperatura interna de aproximadamente 78°C). Mientras se mantenía un reflujo suave, se cargó etanol (3,596 ml) en el frasco durante un período de aproximadamente 20 minutos. Se enfrió luego el frasco de reacción hasta una temperatura interna que varió entre aproximadamente 64-70°C en 15-25 minutos, y se mantuvo esta temperatura por un período de aproximadamente 30 minutos. Se inspeccionó la presencia de cristales en el reactor. Si no había cristales presentes, luego se agregaban cristales de la sal de ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 mg, 0,1 mol %) en el frasco, y se agitaba la reacción a 64-70°C por 30 minutos, antes de inspeccionar nuevamente la presencia de cristales en el frasco. Una vez que había cristales presentes, se reducía la agitación hasta

una menor velocidad y se agitaba la reacción a 64-70°C por otros 90 minutos. Se enfrió la reacción a aproximadamente 0°C por un período de aproximadamente 2 horas, y se filtró la mezcla resultante a través de un filtro fritado de 25-50 micrones. Se lavó el reactor con etanol (484 ml) y se agitó hasta que la temperatura interna fue de aproximadamente 0°C. Se usó el etanol frío para lavar la torta de filtrado, y se repitió este procedimiento 2 veces más. Se secó el sólido recolectado hasta obtener un peso constante a 50°C al vacío, en un horno al vacío, hasta obtener 510,7 g (85.7%) de la sal cristalina amarilla de ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. Se usó una presa de goma o condiciones inertes durante el proceso de filtración. Si bien el sólido seco no parecía ser muy higroscópico, la torta de filtrado húmeda tiende a absorber agua y tornarse pegajosa. Se tomaron precauciones para evitar una exposición prolongada de la torta húmeda de filtrado a la atmósfera.

[0116] El ácido láctico comercial contiene generalmente aproximadamente 8-12% p/p de agua, y contiene dímeros y trímeros, además del ácido láctico monomérico. La relación molar entre el dímero de ácido láctico y el monómero es generalmente de aproximadamente 1.0:4.7. Puede usarse ácido láctico de grado comercial en el proceso que se describió en el párrafo anterior, ya que la sal de monolactato precipita preferiblemente de la mezcla de reacción. Se purifica el monómero de ácido láctico de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Ejemplo 8

[0117] Este estudio evaluó el potencial antiangiogénico del compuesto **1** en el modelo de Matrigel suplido con FGF.

[0118] A ratas hembra BDF1, con una edad de 11-12 semanas (Charles River, Wilmington, MA), se les implantaron 0,5 ml de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) suplidos con 2 μ g de FGF-2. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos suplidos con FGF-2 (neovascularización o angiogénesis) midiendo los niveles de hemoglobina en los tapones de Matrigel, después de retirarlos de los animales.

[0119] La administración oral del artículo de prueba comenzó un día antes de la implantación del Matrigel y continuó una vez por día durante ocho dosis. Se formuló el compuesto **1** como una solución en H_3PO_4 10 mM. Se incluyeron doce grupos de tratamiento: vehículo (H_3PO_4 10 mM) *p.o.*, *q.d.x* 8 días (2 grupos control; ratones implantados con Matrigel sin suministro (nivel basal de hemoglobina) o Matrigel suplido con FGF (control positivo); donde se dosificó el compuesto **1** a razón de 3, 10, 30, 100, 200, 300 mg/kg *p.o.*, *q.d.* x 8 días. Se colocaron 8 ratones en cada grupo, excepto para los ratones dosificados con 200 y 300 mg/kg, que fueron 4 por grupo.

[0120] El porcentaje de inhibición de los niveles de hemoglobina en los ratones tratados con compuesto, comparado con aquél en ratones tratados con vehículo, indica la potencia antiangiogénica del compuesto. Los resultados se expresan como hemoglobina total (mg/dl) por tapón de Matrigel. Se define la ED_{50} como la dosis que inhibe efectivamente la angiogénesis en aproximadamente 50%. Se determinaron las concentraciones de hemoglobina en tapones de Matrigel retirados de ratones y congelados en forma instantánea, usando espectroscopía de absorbancia con reactivo de Drabkin (Sigma Diagnostics, St. Louis MO).

[0121] Para evaluar la exposición del plasma al compuesto **1**, se recolectó

sangre 2 y 24 horas después de 8 dosis consecutivas (día 8). En los grupos con dosis de 200 y 300 mg/kg, se recolectó sangre solamente en el punto de tiempo de 2 horas. Se determinaron las concentraciones de **1** en plasma empleando un ensayo no convalidado de LC/MS/MS, con un rango de calibración de entre 1 y 8000 ng/ml, y un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 ng/ml (Charles River Laboratories, Worcester, MA).

[0122] El día 8, se midieron los niveles de hemoglobina en los tapones de Matrigel y las concentraciones del compuesto **1** en plasma. Se observaron los animales y se midieron los pesos corporales a lo largo del estudio.

[0123] El compuesto **1** resultó en una inhibición significativa de la concentración de hemoglobina en los tapones de Matrigel a cada dosis evaluada, en comparación con los tapones de los animales tratados con vehículo (Tabla 8). La ED₅₀ calculada fue de 2,6 mg/kg. Las dosis de 3 y 10 mg/kg resultaron en una inhibición de 54% y 57%, respectivamente, mientras que las dosis de 30, 100, 200 y 300 mg/kg redujeron la hemoglobina hasta el nivel de Matrigel sin suministro, lo que resultó en una inhibición de 70-92% versus los controles suplidos con FGF. Las concentraciones de compuesto **1** en plasma 2 horas después de la dosis el día 8 mostraron un incremento proporcional con la dosis, con concentraciones que variaron entre 44 ng/ml, a 3 mg/kg, y 3920 ng/ml, a 300 mg/kg (Tabla 9). Todas las dosis fueron bien toleradas y no se observó pérdida de peso alguna.

Tabla 8: Concentraciones de hemoglobina y reducción dependiente de la dosis en las concentraciones de Hb en tapones de Matrigel. Inhibición en Matrigel después de la administración oral del compuesto **1**

Tratamiento	n	Media Hb \pm SD	% de inhibición	Valor de p
-------------	---	-------------------	-----------------	------------

		mg/dl	de Hb versus tratamiento con vehículo de Matrigel + FGF	Prueba de t versus tratamiento con vehículo Matrigel FGF
Matrigel solo	8	26 ± 15		
Matrigel FGF + Vehículo	8	69 ± 34		
300 mg/kg 1	4	6 ± 0,8	91 %	0,005
200 mg/kg 1	4	8 ± 0,3	89 %	0,004
100 mg/kg 1	8	14 ± 7	80 %	<0,0005
30 mg/kg 1	8	20 ± 8	71 %	<0,0005
10 mg/kg 1	8	29 ± 16	58 %	0,010
3 mg/kg 1	8	32 ± 14	54 %	0,012

Tabla 9: Concentraciones de compuesto 1 en plasma medidas después de 8 dosis consecutivas

Dosis de compuesto (mg/kg/día)	1	Concentración media en plasma @ 2 horas# (ng/ml)	Concentración media en plasma @ 24 horas# (ng/ml)
3		44	0 ^a
10		123	0 ^a
30		339	1,4
100		954	24
200		1910	NS
300		3920	NS

^aConcentraciones en plasma menores que el límite inferior de cuantificación (\leq 1 ng/ml)

NS = no se recolectaron muestras

#muestras recolectadas 2 horas y 24 horas después de la dosificación

[0124] Las concentraciones de **1** en plasma (2 horas después de la dosis) aumentaron proporcionalmente con la dosis. Se observó una reducción del contenido de hemoglobina en los tapones de Matrigel dependiente de la dosis y la concentración en plasma. Las concentraciones en plasma (2 horas después de la dosis, día 8) de 44 ng/ml parecen estar asociadas con la actividad antiangiogénica en este modelo.

[0125] En resumen, la inhibición de la hemoglobina por el compuesto **1** resultó ser dependiente de la dosis, con una inhibición significativa después de 8 días de tratamiento. Se observó una inhibición de la hemoglobina estadísticamente significativa con todas las dosis del compuesto **1**. Todas las dosis fueron bien toleradas, sin observarse pérdida de peso o signos clínicos adversos. Se asociaron concentraciones de compuesto **1** en plasma (2 horas después de la dosis) de 44 ng/ml con actividad antiangiogénica en este modelo.

Ejemplo 9

[0126] Se determinó el perfil metabólico del compuesto **1** en plasma de mono en un estudio de múltiples dosis orales de 5 mg/kg BID, a partir de muestras tomadas los días de dosificación 1 y 14. Se identificó un metabolito resultante de la demetilación y se lo caracterizó por LC/UV y LD/MS/MS (compuesto **3**). El compuesto **1** progenitor (P) produjo un ion $M+H^+$ $m/z = 393,3$, con un tiempo de retención cromatográfica de 18,3 minutos. Se identificó un metabolito demetilado (P-CH₃) con una $m/z = 379,3$ ($M+H^+$) y un tiempo de retención

cromatográfica de 18,1 min. La diferencia de masa de 14 daltons entre el metabolito y el compuesto **1** es consistente con un compuesto **1** demetilado. La retención de masa y cromatográfica del metabolito fue idéntica a la del compuesto **3** sintetizado en forma independiente. El metabolito correspondiente al N-óxido de piperazina del compuesto **1** (compuesto de N-óxido **2**) no se detectó en plasma a este nivel de dosificación. Se determinó que los componentes que producían una señal UV a los 17,7 y 18,5 minutos en el cromatograma de absorbancia a 356 nm eran componentes de matriz y no metabolitos, sobre la base de comparaciones de espectro UV con el compuesto **1** y debido a su presencia en plasma vacío (tiempo 0 del día de dosificación 1).

[0127] Se proporcionan los niveles estimados del metabolito demetilado en la Tabla 1. Los niveles estimados de metabolitos (en equivalentes de compuesto **1**) se basan en las relaciones entre las alturas de los picos de absorbancia UV del metabolito, respecto de aquellos del compuesto **1** obtenidos en este análisis, y se los extrapoló factorizando la relación de absorbancia para niveles conocidos de compuesto **1** determinada en las mismas muestras, en un estudio cuantitativo analítico previo. Se determinó que el compuesto progenitor era más abundante que el metabolito en todos los puntos de tiempo agrupados. Se halló que los niveles de compuesto **1** eran sustancialmente menores en las muestras del día 14, en paralelo con el metabolito de N-desmetilo, que fue esencialmente indetectable. No se detectaron otros metabolitos, incluyendo metabolitos del tipo de los conjugados de fase II (glucurónido o sulfato) en estas muestras de plasma tomadas los días de administración de dosis 1 ó 14.

Tabla 10: Niveles del compuesto **1** y niveles estimados del metabolito del compuesto **1** en plasma de rata (N = 2) con dosis orales múltiples de

compuesto 1 (5 mg/kg, BID)

Dosis (mg/kg/día) ^a	Día	Muestras agrupadas Tiempo (horas)	(P-CH ₃) (ng/ml) ^b	Compuesto 1 (ng/ml) ^c
10	1	0	0	0
10	1	1, 2	8.5	28
10	1	4, 8	31	62
10	1	12, 13, 14, 16, 20, 24	10	21
10	14	0	ND	2
10	14	1, 2	ND	4.2
10	14	4, 8	ND	2.2
10	14	12, 13, 14, 16, 20, 24	ND	3.2

a. Las ratas se dosificaron con 5/mg/kg de compuesto 1 BID en intervalos de 12 horas (T = 0 y T = 12 horas).

b. Se estimaron los niveles de metabolito sobre la base de las relaciones de respuesta UV para metabolito/compuesto 1 obtenidas en este estudio, y se factorizo de acuerdo con niveles conocidos de compuesto 1 determinados previamente en un estudio cuantitativo separado.

c. Los niveles de compuesto 1 presentados en esta tabla son valores promediados de niveles cuantificados previamente en un estudio separado.

ND: No detectable

Ejemplo 10

[0128] Se realizaron estudios con plasma y tumores recolectados de ratones

tratados con compuesto **1** para evaluar objetivos farmacodinámicos potenciales. El análisis de la modulación del blanco en tumores KM12L4a después de un tratamiento con el compuesto **1** indicó que la fosforilación de VEGFR1, VEGFR2, PDGFR β y FGFR1 era inhibida de una manera dependiente del tiempo y la dosis. Por ejemplo, las células HMVEC exhibieron una fosforilación de VEGFR2 mediada por la inhibición de VEGF con una IC₅₀ de aproximadamente 0,1 μ M. Además, el tratamiento de células endoteliales con el compuesto **1** inhibió la fosforilación de MAPK y Akt mediada por VEGF.

[0129] Además, se observó una inhibición de la activación de ERK (MAPK), un blanco río abajo de las tirosina quinasas receptoras, dependiente del tiempo y la dosis, con IC₅₀ que variaron entre 0,1 y 0,5 μ M, en células KM12L4A (las células KM12L4A expresan PDGFR β y VEGFR1/2 en sus superficies). Se incubaron células KM12L4A durante 3 horas con el compuesto **1** en DMEM libre de suero. Después de la cosecha, se separaron los lisados por SDS-PAGE y se los sondeó con los anticuerpos fosfor-ERK1/2 y ERK1/2. Para la detección, se usaron reactivos ECL (Amersham). Se mantuvieron los efectos inhibitorios del compuesto **1** sobre la fosforilación del receptor y la activación de ERK por 24 después del tratamiento. La fosforilación de ERK1/2 en células MV4-11 fue inhibida por **1**, con IC₅₀ de entre 0,01 y 0,1 μ M, de una forma dependiente de la dosis.

[0130] Se observó una actividad *in vivo* significativa en el modelo de tumor de colon humano HCT116. En tumores HCT116, el compuesto **1** inhibió la fosforilación de ERK (MAPK) de una forma dependiente del tiempo y la dosis, y se visualizaron cambios significativos en los análisis histológicos de los tumores.

[0131] Estas evaluaciones de PK/PD en modelos preclínicos indican que el compuesto **1** mostró una inhibición dependiente del tiempo y la dosis de ambos receptores blancos y de la molécula señalizadora río abajo, ERK (MAPK). Estos estudios contribuirán a la identificación de biomarcadores potenciales que permitirán monitorear la actividad biológica del compuesto **1** en ensayos clínicos.

Ejemplo 11

[0132] Se determinó la distribución de la radioactividad en tejidos después de la administración de una única dosis oral (PO) (5 mg/kg) de compuesto **1** marcado con ^{14}C (en la posición 4 del anillo de quinolinona) a ratas Sprague Dawley (SD) macho y hembra por autorradiografía de cuerpo entero (WBA). Se recolectaron sangre y cuerpos para WBA en puntos de tiempo específicos durante las 24 horas posteriores a la dosis. Se congelaron los cuerpos en un baño de hexano/hielo seco, se los drenó, se los secó por transferencia y se los colocó en hielo seco o se los almacenó a aproximadamente -70°C por al menos 2 horas. Los cuerpos congelados se embebieron en carboximetilcelulosa congelada, se los congeló en bloques, junto con compuestos de referencia para autorradiografía embebidos, y se los congeló a -20°C hasta analizarlos. Se recolectaron secciones apropiadas con un grosor de $40\text{ }\mu\text{m}$ en cinta adhesiva a 5 niveles de interés en el plano sagital. Todos los tejidos, órganos y fluidos biológicos más importantes estaban representados. Se expusieron pantallas de generación de fosforoimágenes a las secciones y se las analizó, trazándose una curva de referencia para interpolar concentraciones de ^{14}C -**1** en tejido. Se analizó el plasma para determinar la concentración de radioactividad por conteo de centelleo líquido (LSC). Se

presentan resultados ilustrativos en la Tabla 11.

[0133] Después de la administración oral de ^{14}C -1, la radioactividad derivada de ^{14}C -1 se hallaba ampliamente distribuida en todos los tejidos 1 hora después de la dosis, y había alcanzado $C_{\text{máx}}$ en la mayor parte de los tejidos 4 horas después de la dosis. La distribución total de la radioactividad en los tejidos de machos y hembras fue similar. La radioactividad derivada de ^{14}C -1 se despejó más lentamente de los tejidos que del plasma. En machos y hembras, se detectaron las mayores concentraciones de ^{14}C -1 en tejidos, excluyendo el tracto gastrointestinal, a lo largo de las 24 horas, en la glándula harderiana, la glándula adrenal, la médula renal, la glándula lacrimal intra-orbital y la glándula lacrimal exorbital. La radioactividad derivada de ^{14}C -1 cruzó la barrera hematoencefálica después de la administración de una dosis oral.

Tabla 11: Relaciones de concentraciones tejido: plasma determinadas por autorradiografía de cuerpo completo en momentos específicos, después de la administración de única dosis oral de compuesto 1 (5 mg/kg) a ratas macho

	Tejido: relaciones de concentraciones en plasma			
	Cantidad de animales (momento del sacrificio)			
	1	2	3	4
Tejido	(1 Hora)	4 (Horas)	(10 Horas)	(24 Horas)
Glándula adrenal	34,3	33,5	56,0	68,8
Sangre	1,84	1,04	1,35	1,06
Hueso	0,826	0,679	1,00	1,23
Médula ósea	13,8	23,3	29,7	26,9
Ciego	16,9	11,3	23,7	15,9

	Tejido: relaciones de concentraciones en plasma			
	Cantidad de animales (momento del sacrificio)			
	1	2	3	4
Tejido	(1 Hora)	4 (Horas)	(10 Horas)	(24 Horas)
Contenidos del ciego	0,484	15,7	356	130
Cerebelo	4,86	2,63	2,47	1,51
Cerebro	6,16	3,39	3,21	1,71
Fluido cerebroespinal (CSF)	13,7	18,0	24,0	11,5
Diafragma	14,1	9,00	12,2	6,49
Epidídimo	3,61	6,57	9,05	8,53
Contenidos del esófago	2,90	6,82	1,08	1,15
Esófago	98,1	17,7	12,3	7,26
Glándula lacrimal exorbital	17,0	28,9	39,2	59,9
Ojo	0,535	1,01	1,20	1,51
Grasa (abdominal)	3,08	1,89	2,04	1,44
Grasa (parda)	16,2	20,2	16,2	8,85
Glándula harderiana	14,3	34,2	128	300
Glándula lacrimal intra-orbital	16,3	30,4	42,4	63,0
Riñón	45,1	32,4	49,1	24,3
Contenidos del intestino grueso	NA	7,00	454	238

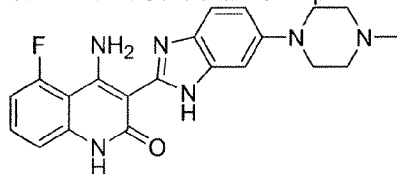
	Tejido: relaciones de concentraciones en plasma			
	Cantidad de animales (momento del sacrificio)			
	1	2	3	4
Tejido	(1 Hora)	4 (Horas)	(10 Horas)	(24 Horas)
Intestino grueso	11,6	12,8	21,8	10,9
Hígado	121	48,9	45,0	44,7
Pulmón	47,2	26,9	28,8	16,8
Médula	4,08	2,76	2,88	1,51
Músculo	5,93	4,64	5,77	2,64
Miocardio	16,8	11,5	11,8	4,62
Turbinarios nasales	4,44	6,29	11,9	11,0
Lóbulo olfativo	3,77	2,27	2,15	1,15
Páncreas	25,7	20,5	29,3	10,5
Glándula pineal	23,0	NA	NA	NA
Glándula pituitaria	20,5	33,9	48,1	21,5
Glándula prepucial	NA	NA	23,3	41,3
Próstata	7,29	11,4	14,2	11,2

NA No aplicable.

[0134] Se comprende que la invención no se limita a las realizaciones que se indican en la presente documentación a modo de ilustración, sino que abarca todas las formas de las mismas, como queda dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de fórmula



una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, CARACTERIZADO PORQUE es en la preparación de un medicamento, bajo la forma de dosificaciones unitarias, para el tratamiento del cáncer, donde cada dosis unitaria del medicamento es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto,
- (b) entre aproximadamente 10 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración al sujeto, o
- (c) una AUC de entre aproximadamente 500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 750 y 120000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto.

2. El uso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del

compuesto en la sangre del sujeto,

(b) entre aproximadamente 20 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o

(c) una AUC de entre aproximadamente 1000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 1500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

3. El uso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

(a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 50 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 100 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,

(b) entre aproximadamente 40 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o

(c) una AUC de entre aproximadamente 2000 y 15000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 3000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

4. El uso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

(a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, o

(b) entre aproximadamente 40 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración.

5. El uso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 100 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

6. El uso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{\text{máx}}$ de entre 100 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 200 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, CARACTERIZADO PORQUE se usa la sal de lactato del compuesto para preparar el medicamento.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, CARACTERIZADO PORQUE el medicamento es apropiado para una administración oral.

9. El uso de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE la forma de dosificación unitaria del medicamento es una píldora, una cápsula, una tableta, una cápsula de gel, una pastilla, una suspensión o una solución acuosa.

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, CARACTERIZADO PORQUE el medicamento es apropiado para una administración por inyección, tal como por bolo pequeño, infusión lenta o infusión a largo plazo.

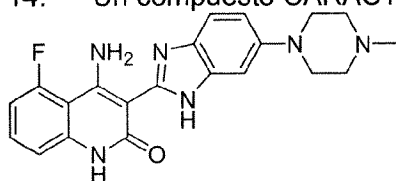
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria del medicamento comprende entre 0,25 y 30

mg/kg del compuesto, el tautómero y/o sus sales, sobre la base del peso corporal del sujeto.

12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria del medicamento comprende una cantidad del compuesto, el tautómero y/o sus sales que varía entre 25 y 1500 mg.

13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, CARACTERIZADO PORQUE el medicamento está dispuesto en un equipo que comprende una cantidad de 7, 14, 21 ó 28 de dichas dosis unitarias diarias, donde el equipo es adecuado para usar en un ciclo de tratamiento que comprende administrar la cantidad diaria del compuesto cada uno de los 7, 14, 21 ó 28 días, seguidos por 7 ó 14 días sin administrar el compuesto.

14. Un compuesto CARACTERIZADO PORQUE tiene la fórmula



una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, para usar en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar una cantidad de dicho compuesto a un paciente con cáncer, en una cantidad suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

- (a) una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 20 y 4000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{\text{máx}}$ de entre aproximadamente 40 y 8000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto,
- (b) entre aproximadamente 10 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 20 y

4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración al sujeto, o

(c) una AUC de entre aproximadamente 500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 750 y 120000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto, cuando se lo administra al sujeto.

15. El compuesto de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

(a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,

(b) entre aproximadamente 20 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 40 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración, o

(c) una AUC de entre aproximadamente 1000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 1500 y 60000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

16. El compuesto de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

(a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 50 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 100 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto,

(b) entre aproximadamente 40 y 500 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 1000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la

administración, o

(c) una AUC de entre aproximadamente 2000 y 15000 ng*h/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o entre aproximadamente 3000 y 30000 ng*h/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

17. El compuesto de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener al menos uno de los siguientes:

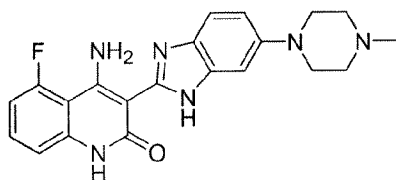
(a) una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 75 y 150 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 150 y 300 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto, o

(b) entre aproximadamente 40 y 250 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto 24 horas después de la administración, o entre aproximadamente 80 y 500 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto 24 horas después de la administración.

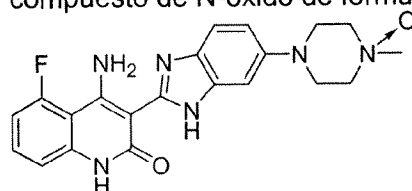
18. El compuesto de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 100 y 2000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 200 y 4000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

19. El compuesto de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE cada dosis unitaria es suficiente para obtener una $C_{m\acute{a}x}$ de entre 100 y 1000 ng/ml del compuesto en el plasma del sujeto, o una $C_{m\acute{a}x}$ de entre aproximadamente 200 y 2000 ng/ml del compuesto en la sangre del sujeto.

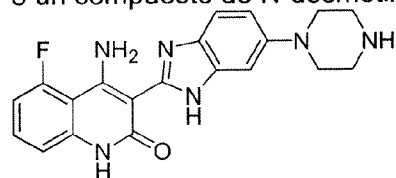
20. El uso de un metabolito para determinar un perfil metabólico para un compuesto que tiene la fórmula:



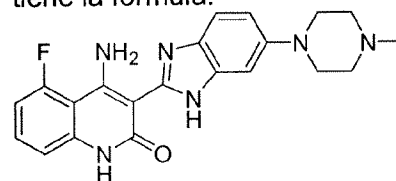
una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE el metabolito comprende al menos uno entre un compuesto de N-óxido de fórmula:



o un compuesto de N-desmetilo de fórmula:



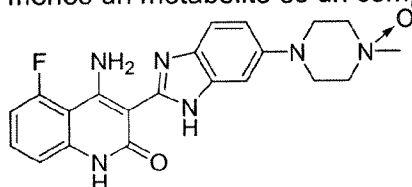
21. Un método para determinar a perfil metabólico para un compuesto que tiene la fórmula:



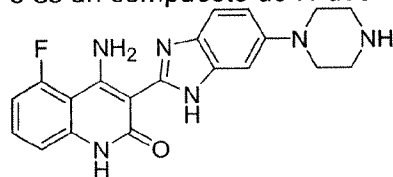
una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE comprende medir la cantidad de al menos un metabolito del compuesto en una o más muestras de orina, sangre o tejido tomadas del sujeto.

22. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE el al

menos un metabolito es un compuesto de N-óxido que tiene la fórmula:



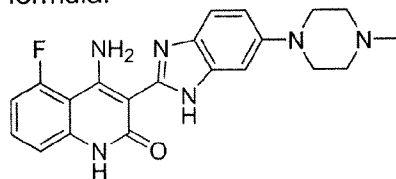
o es un compuesto de N-desmetilo que tiene la fórmula:



23. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende medir la cantidad de compuesto de N-óxido y compuesto de N-desmetilo.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, CARACTERIZADO PORQUE el metabolito se mide por espectroscopía ultravioleta o cromatografía líquida-espectroscopía de masa.

25. Un método para determinar la cantidad de un compuesto que tiene la fórmula:

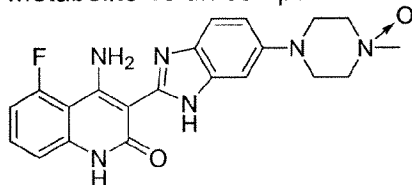


una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE comprende medir la cantidad del compuesto en una muestra de orina, sangre o tejido tomada del sujeto después de que se ha administrado el compuesto al sujeto.

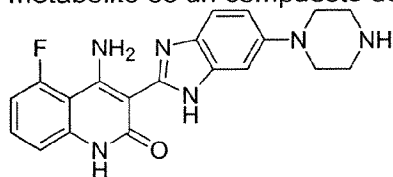
26. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE

comprende además medir la cantidad de un metabolito del compuesto en la muestra.

27. El método de la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE el metabolito es un compuesto de N-óxido que tiene la fórmula:

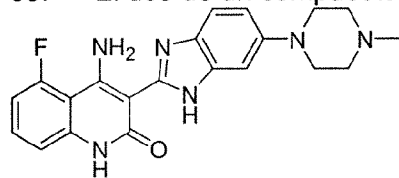


28. El método de la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE el metabolito es un compuesto de N-desmetilo que tiene la fórmula:



29. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE comprende además tomar dos o más muestras del sujeto en momentos diferentes después de administrar el compuesto al sujeto.

30. El uso de un compuesto de fórmula



una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, un tautómero del mismo, o una sal del tautómero aceptable para uso farmacéutico, CARACTERIZADO PORQUE es en la preparación de un medicamento, bajo la forma de dosificaciones unitarias, para el tratamiento del cáncer, donde cada dosis unitaria del medicamento comprende el compuesto en una cantidad de entre 25 mg y 1000 mg.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y MÉTODOS RELACIONADOS

RESUMEN

Métodos de tratamiento del cáncer usando 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En particular, los métodos son eficaces para el tratamiento de tumores sólidos o leucemias, incluidos cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, carcinoma de célula pequeña, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica o enfermedad mieloproliferativa. También se proveen métodos para medir la cantidad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y determinar un perfil metabólico para la misma.

Textos de las Figuras

Figura 1

Vehículo

Volumen tumoral medio

Día de tratamiento

Figura 2

% de inhibición del crecimiento tumoral

METHODS OF TREATING CANCER AND RELATED METHODS

Cross-References to Related Applications

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/478,916 filed June 16, 2003; U.S. Provisional Application No. 60/460,369 filed April 3, 2003; U.S. Provisional Application No. 60/460,327 filed April 3, 2003; U.S. Provisional Application No. 60/460,493 filed April 3, 2003; U.S. Provisional Application No. 60/460,328 filed April 3, 2003; U.S. Provisional Application No. 60/426,204 filed November 13, 2002; U.S. Provisional Application No. 60/426,226 filed November 13, 2002; U.S. Provisional Application No. 60/426,282 filed November 13, 2002; U.S. Provisional Application No. 60/426,107 filed November 13, 2002, and the U.S. Provisional Application titled "Methods of Treating Cancer and Related Methods" filed on November 7, 2003, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety and for all purposes as if fully set forth herein.

Field of the Invention

[0002] This invention relates to methods of treating cancer with a receptor tyrosine kinase inhibitor. The invention also relates to methods of measuring the amounts and concentrations of the inhibitor and its metabolites after administration of the inhibitor to a subject.

Background of the Invention

[0003] Capillaries reach into almost all tissues of the human body and supply tissues with oxygen and nutrients as well as removing waste products. Under typical conditions, the endothelial cells lining the capillaries do not divide, and capillaries, therefore, do not normally increase in number or size in a human adult. Under certain normal conditions, however, such as when a tissue is damaged, or during certain parts of the menstrual cycle, the capillaries begin to proliferate rapidly. This process of forming new capillaries from pre-existing blood vessels is known as angiogenesis or neovascularization. See Folkman, J. Scientific American 275, 150-154 (1996). Angiogenesis during wound healing is an example of

pathophysiological neovascularization during adult life. During wound healing, the additional capillaries provide a supply of oxygen and nutrients, promote granulation tissue, and aid in waste removal. After termination of the healing process, the capillaries normally regress. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999).

[0004] Angiogenesis also plays an important role in the growth of cancer cells. It is known that once a nest of cancer cells reaches a certain size, roughly 1 to 2 mm in diameter, the cancer cells must develop a blood supply in order for the tumor to grow larger as diffusion will not be sufficient to supply the cancer cells with enough oxygen and nutrients.

[0005] Receptor tyrosine kinases (RTKs) are transmembrane polypeptides that regulate developmental cell growth and differentiation, remodeling and regeneration of adult tissues. Mustonen, T. et al., J. Cell Biology 129, 895-898 (1995); van der Geer, P. et al. Ann Rev. Cell Biol. 10, 251-337 (1994). Polypeptide ligands known as growth factors or cytokines, are known to activate RTKs. Signaling RTKs involves ligand binding and a shift in conformation in the external domain of the receptor resulting in its dimerization. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors". Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999); Ullrich, A. et al., Cell 61, 203-212 (1990). Binding of the ligand to the RTK results in receptor trans-phosphorylation at specific tyrosine residues and subsequent activation of the catalytic domains for the phosphorylation of cytoplasmic substrates. Id.

[0006] Two subfamilies of RTKs are specific to the vascular endothelium. These include the vascular endothelial growth factor (VEGF) subfamily and the Tie receptor subfamily. Class III RTKs include VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3. Shibuya, M. et al., Oncogene 5, 519-525 (1990);

Terman, B. et al., *Oncogene* 6, 1677-1683 (1991); Aprelikova, O. et al., *Cancer Res.* 52, 746-748 (1992).

[0007] Members of the VEGF subfamily have been described as being able to induce vascular permeability and endothelial cell proliferation and further identified as a major inducer of angiogenesis and vasculogenesis. Ferrara, N. et al., *Endocrinol. Rev.* 18, 4-25 (1997). VEGF is known to specifically bind to RTKs including VEGFR-1 and VEGFR-2. DeVries, C. et al., *Science* 255, 989-991 (1992); Quinn, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7533-7537 (1993). VEGF stimulates the migration and proliferation of endothelial cells and induces angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*. Connolly, D. et al., *J. Biol. Chem.* 264, 20017-20024 (1989); Connolly, D. et al., *J. Clin. Invest.* 84, 1470-1478 (1989); Ferrara, N. et al., *Endocrino. Rew.* 18, 4-25 (1997); Leung, D. et al., *Science* 246, 1306-1309 (1989); Plouet, J. et al., *EMBO J* 8, 3801-3806 (1989).

[0008] Because angiogenesis is known to be critical to the growth of cancer and to be controlled by VEGF and VEGF-RTK, substantial efforts have been undertaken to develop therapeutics that are antagonists of VEGF-RTK to thereby inhibit or retard angiogenesis, and, hopefully, interfere or stop tumor proliferation.

[0009] Platelet derived growth factor receptor kinase (PDGFRK) is another type of RTK. PDGF expression has been shown in a number of different solid tumors, from glioblastomas to prostate carcinomas. In these various tumor types, the biological role of PDGF signaling can vary from autocrine stimulation of cancer cell growth to more subtle paracrine interactions involving adjacent stroma and angiogenesis. Therefore, inhibiting the PDGFR kinase activity with small molecules may interfere with tumor growth and angiogenesis.

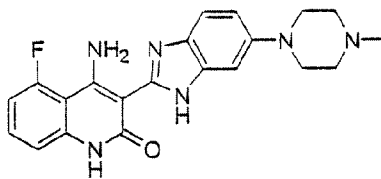
[0010] 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one is a small molecule inhibitor of VEGF-RTK, PDGF-

RTK and other receptor tyrosine kinases such as fibroblast growth factor receptor (FGF-RTK). This compound has been described in a patent and several patent applications, the entire disclosures of which are incorporated herein by reference and for all purposes: U.S. Patent No. 6,605,617, U.S.S.N. 10/644,055, U.S. Provisional Application Nos. 60/405,729, 60/428,210, and 60/484,048. Specific methods for administering this compound are needed as are methods for determining the metabolic profile of this potent anticancer agent.

Summary of the Invention

[0011] The instant invention provides methods of treating cancer, including leukemias and solid tumors. In particular there are provided methods for attaining sufficient blood levels of 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one in a subject to inhibit the growth of a cancer. This compound is an inhibitor of receptor tyrosine kinases. There are further provided compounds as biomarkers and methods for the use of such compounds to monitor the distribution and metabolism of the inhibitor in a subject. In addition, the present invention provides pharmaceutical compositions and medicaments comprising the inhibitor and their methods of use.

[0012] Thus, in accordance with the invention, there are provided methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a sufficient amount of a compound of formula I:



I

a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer to provide a C_{max} of about 20 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 40

to 8000 ng/mL of the compound in the subject's blood. In some embodiments, the amount of the compound administered is sufficient to provide a C_{max} of about 35 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 70 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 50 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 50 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 100 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood, or a C_{max} of 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's blood. The lactate salt of the compound of formula I is administered to the subject in some embodiments, and in some such embodiments the subject is a human. The compound, tautomers, or salts thereof may be formulated as pills, capsules, tablets, gelcaps, caplets, suspensions, aqueous solutions, or other forms as described herein. In some such embodiments, the lactate salt is in an aqueous solution and is administered orally to the human subject. In other embodiments, the compound may be administered by injection.

[0013] In a further aspect, the present invention provides methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a sufficient amount of a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer to provide about 10 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 20 to 4,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration. In some embodiments, the amount of the compound administered is sufficient to provide about 20 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 40 to 2,000 ng/mL of the compound in the

subject's blood 24 hours after administration, about 40 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or about 40 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration. In some embodiments, the subject is a human. Commonly, in the present methods of treating cancer, the lactate salt of the compound of formula I is administered to the subject. In some such embodiments, the lactate salt is in a pill, capsule, tablet, gelcap, caplet, suspension, or aqueous solution and is administered orally to the human subject.

[0014] Thus, in certain embodiments of the present methods of treating cancer, the compound of formula I is administered as a pharmaceutical composition or medicament comprising fructose. In some such embodiments, the pharmaceutical composition further comprises a flavoring agent such as tetarome mandarine flavor. In other embodiments, the pharmaceutical composition further comprises water. Hence, the present methods of treating cancer may further comprise mixing the solid compound of formula I with water to form an aqueous mixture before administering the compound to the subject. The invention further provides the use of the compound of formula I in preparing a medicament for use in treating cancer.

[0015] In other embodiments of the methods of treating cancer described herein, the compound is administered as a pharmaceutical composition selected from granules, powders, suspensions, tablets, pills, capsules, gelcaps, caplets, emulsions, syrups, elixirs, slurries, sprays, aerosols, suppositories, or solutions. Preferably, the pharmaceutical composition is selected from tablets, pills, capsules, gelcaps, or caplets.

[0016] In still other embodiments of the methods of treating cancer described herein, the compound is administered by injection as a short bolus,

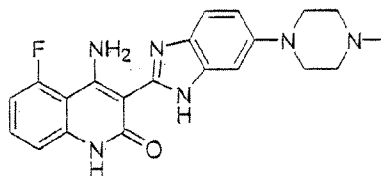
slow infusion, or long-term infusion. The injection may be administered once, twice, three times, or four times daily.

[0017] In some embodiments of the present methods of treating cancer, the amount of the compound of formula I administered to the subject ranges from 0.25 to 30 mg/kg body weight of the subject. In other embodiments, the amount of the compound administered to the subject ranges from about 25 to 1500 mg/day and, preferably, from about 200 to 500 mg/day.

[0018] The present methods of treating cancer are effective against a wide variety of cancers including those in which the cancer to be treated is a solid tumor or leukemia. In particular, the present methods may be used to treat cancers such as prostate, colorectal, breast, multiple myeloma, pancreatic, small cell carcinoma, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, myelo-proliferative disease, non-small cell lung, small cell lung, chronic lymphoid leukemia, sarcoma, melanoma, lymphoma, thyroid, neuroendocrine, renal cell, gastric, gastrointestinal stromal, glioma, brain or bladder.

[0019] In some embodiments, the methods of treating cancer described herein further comprise administering the compound of formula I as part of a treatment cycle. Thus, the treatment cycle may comprise administering the amount of the compound of formula I daily for 7, 14, 21, or 28 days, followed by 7 or 14 days without administration of the compound. In some embodiments, the treatment cycle comprises administering the amount of the compound daily for 7 days, followed by 7 days without administration of the compound. A treatment cycle may be repeated one or more times to provide a course of treatment. In addition, the compound may be administered once, twice, three times, or four times daily during the administration phase of the treatment cycle. In other embodiments, the methods further comprise administering the amount of the compound once, twice, three times, or four times daily or every other day during a course of treatment.

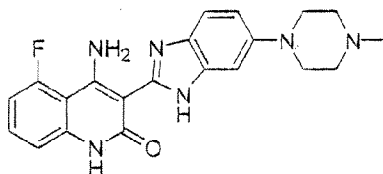
[0020] There are further provided methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a sufficient amount of a compound having the formula:



a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer to provide an AUC of about 500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 750 to 120,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood. In other such embodiments, the amount of the compound administered is sufficient to provide an AUC of about 1,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 1,500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood. In other such embodiments, the AUC is about 2,000 to 15,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 3,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

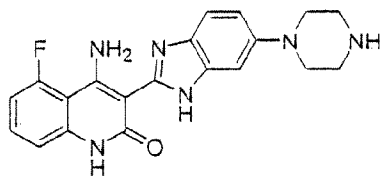
[0021] The present invention further provides methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, wherein the amount of compound administered in a first treatment cycle is 25 mg per day, and the amount of compound administered is increased with each subsequent treatment cycle until either 1500 mg of compound is administered to the subject per day or dose-limiting toxicity is observed in the subject. Typically in such methods, the amount of compound administered is doubled with each subsequent treatment cycle after the first. In some embodiments, the treatment cycle comprises administering the same amount of the compound daily for 7 days followed by 7 days without administration of the compound.

[0022] In another aspect, the invention provides methods of treating cancer, comprising administering to a subject having cancer, a sufficient amount of a compound having the formula I

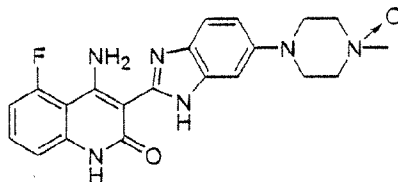


I

a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, and exposing the subject to one or both compounds of formula II and formula III selected from:



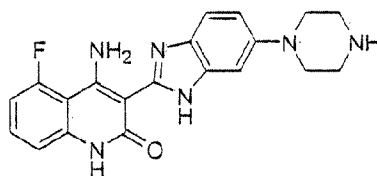
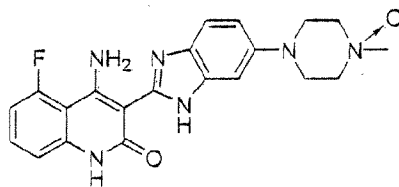
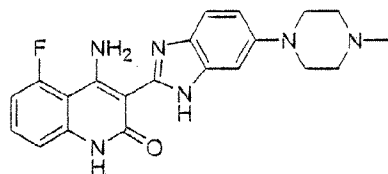
II or



III,

whereby one or both of the compounds of formula II and formula III are produced by metabolism of the compound of formula I by the subject, to provide a combined C_{max} for one or more of the compounds of formula I, formula II, and formula III ranging from about 20 to about 4000 ng/mL in the subject's plasma or a combined C_{max} for one or more of the compounds of formula I, formula II, and formula III ranging from about 40 to about 8000 ng/mL in the subject's blood.

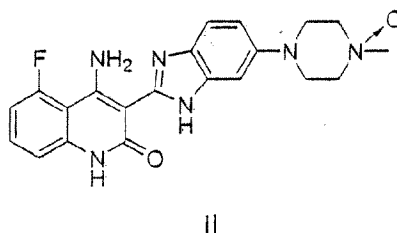
[0023] In yet another aspect, the present invention provides methods for treating cancer comprising exposing a subject having cancer to a sufficient amount of one or more compounds having a formula selected from:



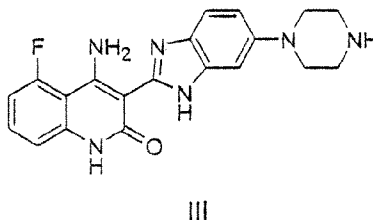
an active metabolite thereof, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, sufficient to provide a combined C_{max} of about 20 to 4000 ng/mL of the one or more compounds in the subject's plasma or a combined C_{max} of about 40 to 8000 ng/mL of the one or more compound in the subject's blood. In some embodiments, the amount of the one or more compounds provides a C_{max} for one of the compounds of about 35 to 2600 ng/mL in the subject's plasma or a C_{max} for one of the compounds of about 35 to 6000 ng/mL in the subject's blood. In other embodiments, the amount of the one or more compounds provides a C_{max} for one of the compounds of about 35 to 1200 ng/mL in the subject's plasma or a C_{max} for one of the compounds of about 50 to 2400 ng/mL in the subject's blood.

[0024] In other aspects of the invention, there are provided methods for determining a metabolic profile for a compound of formula I, a

pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in a subject, the method comprising measuring the amount of at least one metabolite of the compound in one or more samples of urine, blood, or tissue taken from the subject. In some such embodiments, at least one metabolite is an N-oxide compound having formula II:



[0025] In other such embodiments, at least one metabolite is an N-desmethyl compound having formula III:



[0026] In some such embodiments, the at least one metabolite further includes a second metabolite that is an N-oxide compound of formula II. The amount of metabolites may be measured using techniques, including ultraviolet (UV) spectroscopy and/or liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS).

[0027] In other aspects of the invention, there are provided methods of determining the amount of a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer in a subject, the method comprising measuring the amount of the compound in a sample of urine, blood, or tissue taken from the subject after the compound has been administered to the subject. This

method may further comprise measuring the amount of a metabolite of the compound in the sample. Metabolites that may be measured include, but are not limited to, the N-oxide compound of formula II and/or the N-desmethyl compound having formula III. In some embodiments, the method further comprises withdrawing two or more samples from the subject at different times after the compound of formula I has been administered to the subject.

[0028] Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating certain embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

Brief Description of the Drawings

[0029] FIG. 1 shows KM12L4a tumor inhibition by the compound of formula I.

[0030] FIG. 2 shows the C_{max} and AUC values versus percent inhibition of KM12L4a tumor growth in KM12L4a tumor-bearing mice.

Detailed Description

[0031] The instant invention relates to methods for the treatment of cancer using the compound of formula I, methods for measuring the amount of the compound of formula I and/or its metabolites in biological samples taken from a subject, and pharmaceutical compositions and medicaments comprising the compound of formula I and methods of use thereof.

[0032] The following terms and phrases as defined herein are used throughout this specification.

[0033] As employed herein, "AUC" refers to area under the curve in a graph of the concentration of a compound in blood plasma over time.

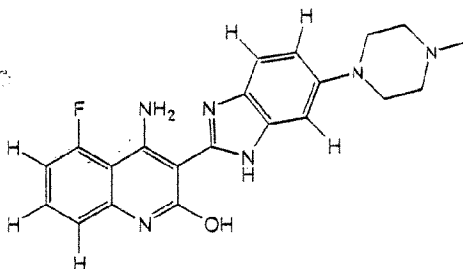
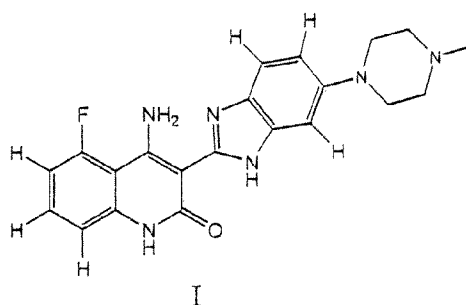
[0034] As employed herein, " C_{\max} " refers to the maximum concentration of a compound in the plasma, tissue, or blood of a subject to which the compound has been administered. C_{\max} typically occurs within several hours of administration of a compound to a subject.

[0035] Dose limiting toxicity is defined in accordance with the Common Terminology Criteria of Adverse Events Version 3.0 (CTCAE). Thus, dose limiting toxicity occurs upon administration of a compound to a subject if any of the following events are observed within a drug treatment cycle: Grade 4 neutropenia (i.e., absolute neutrophil count (ANC) ≤ 500 cells/mm³) for 5 or more consecutive days or febrile neutropenia (i.e., fever $\geq 38.5^{\circ}$ C with an ANC ≤ 1000 cells/mm³); Grade 4 thrombocytopenia (i.e., $\leq 25,000$ cells/mm³ or bleeding episode requiring platelet transfusion); Grade 4 fatigue, or a two-point decline in ECOG performance status; Grade 3 or greater nausea, diarrhea, vomiting, and/or myalgia despite the use of adequate/maximal medical intervention; Grade 3 or greater non-hematological toxicity (except fatigue); retreatment delay of more than 2 weeks due to delayed recovery from toxicity related to treatment with compound 1; Grade 2 or greater cardiac toxicity of clinical significance (e.g., a decline in the resting ejection fraction to 40% - \leq 50% or shortening fraction to 15% - \leq 24%; cardiac troponin T ≥ 0.05 ng/mL).

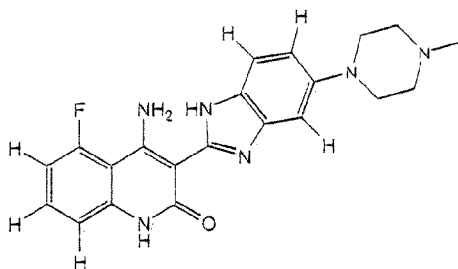
[0036] Pharmaceutically acceptable salts include a salt with an inorganic base, organic base, inorganic acid, organic acid, or basic or acidic amino acid. As salts of inorganic bases, the invention includes, for example, alkali metals such as sodium or potassium, alkali earth metals such as calcium and magnesium, aluminum, and ammonia. As salts of organic bases, the invention includes, for example, trimethylamine, triethylamine, pyridine, picoline, ethanolamine, diethanolamine, and triethanolamine. As salts of inorganic acids, the instant invention includes, for example, hydrochloric acid, hydroboric acid, nitric acid, sulfuric acid, and phosphoric acid. As salts of organic acids, the instant invention includes, for example, lactic acid, formic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid, fumaric acid, oxalic acid, tartaric acid,

maleic acid, citric acid, succinic acid, malic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, and p-toluenesulfonic acid. As salts of basic amino acids, the instant invention includes, for example, arginine, lysine and ornithine. Acidic amino acids include, for example, aspartic acid and glutamic acid.

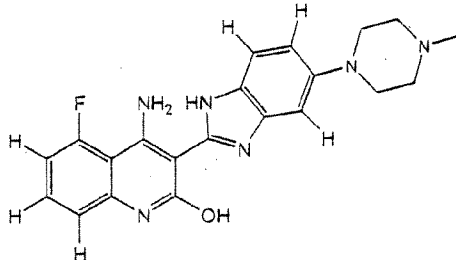
[0037] It should be understood that the organic compounds according to the invention may exhibit the phenomenon of tautomerism. As the chemical structures within this specification can only represent one of the possible tautomeric forms at a time, it should be understood that the invention encompasses any tautomeric form of the drawn structure. For example, the compound of formula I is shown below with one tautomer, Tautomer Ia:



[0038] Other tautomers of the compound of formula I, Tautomer Ib and Tautomer Ic, are shown below:



Tautomer Ib



Tautomer Ic

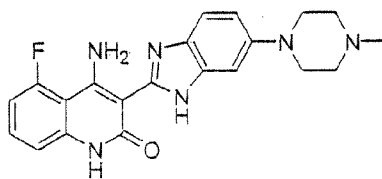
[0039] As readily understood by one skilled in the art, a wide variety of functional groups and other structures may exhibit tautomerism, and all tautomers of compounds having formula I are within the scope of the present invention.

[0040] The term "subject" as used herein refers to any animal that can experience the beneficial effects of the methods of the invention. Thus, a compound of formula I, pharmaceutically acceptable salts thereof, tautomers thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of a tautomer can be administered to any animal that can experience the beneficial effects of the compound in accordance with the methods of treating cancer provided by the invention. Preferably, the animal is a mammal, and in particular a human, although the invention is not intended to be so limited. Examples of other suitable animals include, but are not limited to, rats, mice, monkeys, dogs, cats, cattle, horses, pigs, sheep, and the like.

[0041] "Treating" within the context of the instant invention means an alleviation of symptoms associated with a disorder or disease, or halt of further progression or worsening of those symptoms, or prevention or

prophylaxis of the disease or disorder. For example, within the context of cancer, successful treatment may include an alleviation of symptoms or halting the progression of the disease, as measured by a reduction in the growth rate of a tumor, a halt in the growth of the tumor, a reduction in the size of a tumor, partial or complete remission of the cancer, or increased survival rate or clinical benefit.

[0042] In one aspect, the present invention provides methods for treating cancer including administering to a subject having cancer a sufficient amount of a compound of formula I:



I

a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer to provide a C_{max} of about 20 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 40 to 8000 ng/mL of the compound in the subject's blood. In some embodiments, the amount of the compound of formula I administered is sufficient to provide a C_{max} of about 35 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 70 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 50 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 50 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood, a C_{max} of about 100 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood, or a C_{max} of 100 to 1000 ng/mL of the compound in the

subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's blood. Preferably the amount of the compound administered is sufficient to provide a C_{max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood. Thus, it is to be understood that the C_{max} provided by the sufficient amount of the compound of formula I, tautomers, and salts thereof falls within the given ranges.

[0043] In a further aspect, the present invention provides methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a sufficient amount of a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer to provide about 10 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 20 to 4,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration. In some embodiments, the amount of the compound administered is sufficient to provide about 20 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 40 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, about 40 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or about 40 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration.

[0044] Typically, in the methods of treating cancer described herein, the compound of formula I or a tautomer thereof is administered as a pharmaceutically acceptable salt. Salts such as lactate, malate, mesylate, acetate, tartrate, phosphate, sulfate, nitrate, HCl, citrate, or maleate in various molar ratios and in their enantiomeric or racemic forms are suitable. Preferably, the lactate salt of the compound of formula I is administered to a subject such as a human subject. The lactate salt is conveniently administered to the patient in a pill, capsule, tablet, gelcap, caplet,

suspension, or aqueous solution and is administered orally. In other embodiments, the compound or salt may be administered by injection as described below.

[0045] Thus, in some embodiments of the present methods of treating cancer, the compound of formula I is administered as a pharmaceutical composition or medicament that includes fructose. Such compositions may also include a flavoring agent such as tetarome mandarine flavor or the like and/or a diluent, such as water. Hence, the present methods of treating cancer may further include mixing the solid compound of formula I with water to form an aqueous mixture before administering the compound to the subject. The invention further provides the use of the compound 1 of formula I in preparing a medicament for use in treating cancer.

[0046] In some embodiments of the present methods of treating cancer, the amount of the compound of formula I administered to the subject ranges from 0.25 to 30 mg/kg body weight of the subject. In other embodiments, the amount of the compound administered to the subject ranges from about 25 to 1500 mg/subject per day, from about 100 to 1000 mg/subject per day, or from about 200 to 500 mg/subject per day.

[0047] The present methods of treating cancer are effective against a wide variety of cancers including those in which the cancer to be treated is a solid tumor or leukemia. In particular, the present methods may used to treat cancers such as prostate, colorectal, breast, multiple myeloma, pancreatic, small cell carcinoma, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, myelo-proliferative disease, nonsmall cell lung, small cell lung, chronic lymphoid leukemia, sarcoma, melanoma, lymphoma, thyroid, neuroendocrine, renal cell, gastric, gastrointestinal stromal, glioma, brain or bladder. While not wishing to be bound by theory, it is believed that the present methods of treating cancer are effective against solid tumors because the compound of formula I acts as an angiogenesis inhibitor. More specifically, the compound of formula I and its active metabolites are believed

to selectively inhibit certain receptor tyrosine kinases involved in tumor angiogenesis and in leukemias.

[0048] In some embodiments, the present methods of treating cancer further include administering the compound of formula I as part of a treatment cycle. A treatment cycle includes an administration phase during which the compound is given to the subject on a regular basis and a holiday, during which the compound is not administered. For example, the treatment cycle may comprise administering the amount of the compound of formula I daily for 7, 14, 21, or 28 days, followed by 7 or 14 days without administration of the compound. In some embodiments, the treatment cycle comprises administering the amount of the compound daily for 7 days, followed by 7 days without administration of the compound. A treatment cycle may be repeated one or more times to provide a course of treatment. In addition, the compound may be administered once, twice, three times, or four times daily during the administration phase of the treatment cycle. In other embodiments, the methods further comprise administering the amount of the compound once, twice, three times, or four times daily or every other day during a course of treatment. A course of treatment refers to a time period during which the subject undergoes treatment for cancer by the present methods. Thus, a course of treatment may extend for one or more treatment cycles or refer to the time period during which the subject receives daily or intermittent doses of the compound of formula I.

[0049] There are further provided methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a sufficient amount of a compound of formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer to provide an AUC of about 500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 750 to 120,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood. In other such embodiments, the amount of the compound administered is sufficient to provide an AUC of about 1,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 1,500 to 60,000 ng*h/mL of the

compound in the subject's blood. In other such embodiments, the AUC is about 2,000 to 15,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 3,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

[0050] In another aspect of the invention, there is provided the use of a compound of formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in the preparation of a medicament, in unit dosage form, for treating cancer, wherein each unit dose of the medicament is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{max} of about 20 to 4000 ng/mL of the compound in a subject's plasma or a C_{max} of about 40 to 8000 ng/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject,
- (b) about 10 to 2,000 ng/mL of the compound in a subject's plasma 24 hours after administration or about 20 to 4,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration to the subject, or
- (c) an AUC of about 500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in a subject's plasma or about 750 to 120,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject.

[0051] In some embodiments of the use of a compound of formula I in the preparation of a medicament for treating cancer, each unit dose is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{max} of about 50 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's blood,
- (b) about 20 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 40 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or

(c) an AUC of about 1,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 1,500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

[0052] In other embodiments, each unit dose is sufficient to provide at least one of

(a) a C_{max} of about 50 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood,

(b) about 40 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or

(c) an AUC of about 2,000 to 15,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 3,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

[0053] In still other embodiments, each unit dose is sufficient to provide at least one of

(a) a C_{max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood, or

(b) about 40 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration.

[0054] In another embodiment, each unit dose is sufficient to provide a C_{max} of about 100 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood; or a C_{max} of 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's blood.

[0055] Typically, in the uses of the compound of formula I described herein, the lactate salt of the compound is used to prepare the medicament. Such medicaments are suitable for oral administration. The unit dosage form of the medicament includes but is not limited to a pill, capsule, tablet, gelcap, caplet, suspension, or aqueous solution. In addition, the medicament is suitable for administration by injection as a short bolus, slow infusion, or long-term infusion.

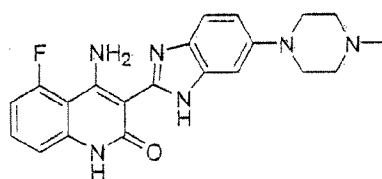
[0056] The compounds of formula I, formula II, and formula III may be accompanied with instructions that describe any of the methods of the invention. Therefore, in some embodiments, the invention provides at least one compound of formula I, formula II, and/or formula III in combination with instructions for use in a method of treating cancer or analyzing the metabolic profile of the compound of formula I.

[0057] The present invention further provides methods for treating cancer comprising administering to a subject having cancer a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, wherein the amount of compound administered in a first treatment cycle is 25 mg per day, and the amount of compound administered is increased with each subsequent treatment cycle until either 1500 mg of compound is administered to the subject per day or dose-limiting toxicity is observed in the subject. Typically in such methods, the amount of compound administered is doubled with each subsequent treatment cycle after the first. In some embodiments, the treatment cycle comprises administering the same amount of the compound daily for 7 days followed by 7 days without administration of the compound.

[0058] Likewise, in some embodiments of the use of a compound of formula I in the preparation of a medicament as described herein, each unit dose of the medicament includes from 0.25 to 30 mg/kg of the compound, tautomer, and/or salts based on the body weight of the subject. Furthermore, each unit dose of the medicament may include an amount of the compound,

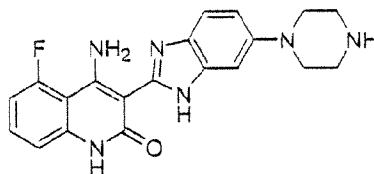
tautomer, and/or salts ranging from 25 to 1500 mg. The medicament may be arranged in a kit comprising 7, 14, 21 or 28 daily amounts of said unit doses, the kit being suitable for use in a treatment cycle comprises administering the daily amount of the compound for each of 7, 14, 21, or 28 days, followed by 7 or 14 days without administration of the compound.

[0059] In another aspect, the invention provides methods of treating cancer, comprising administering to a subject having cancer, a sufficient amount of a compound having the formula I

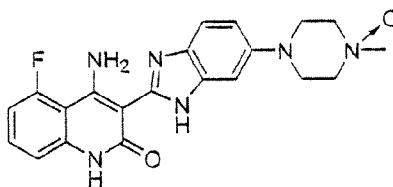


I

a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, and exposing the subject to one or both compounds of formula II and formula III selected from:



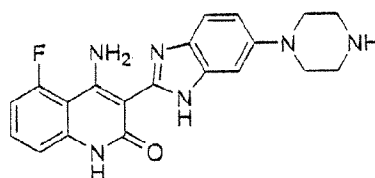
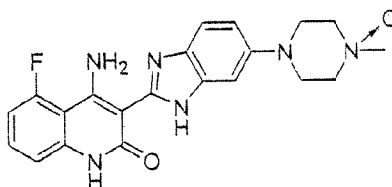
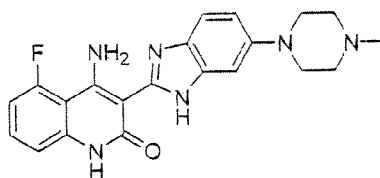
II or



III,

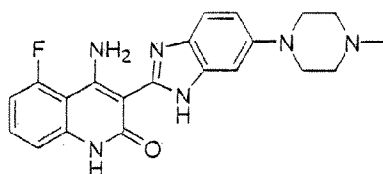
whereby one or both of the compounds of formula II and formula III are produced by metabolism of the compound of formula I by the subject, to provide a combined C_{\max} for one or more of the compounds of formula I, formula II, and formula III ranging from about 20 to about 4000 ng/mL in the subject's plasma or a combined C_{\max} for one or more of the compounds of formula I, formula II, and formula III ranging from about 40 to about 8000 ng/mL in the subject's blood.

[0060] In yet another aspect, the present invention provides methods for treating cancer comprising exposing a subject having cancer to a sufficient amount of one or more compounds having a formula selected from:

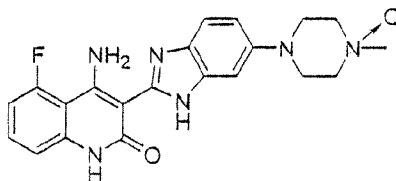


an active metabolite thereof, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, sufficient to provide a combined C_{\max} of about 20 to 4000 ng/mL of the one or more compounds in the subject's plasma or a combined C_{\max} of about 40 to 8000 ng/mL of the one or more compound in the subject's blood. In some embodiments, the amount of the one or more compounds provides a C_{\max} for one of the compounds of about 35 to 2600 ng/mL in the subject's plasma or a

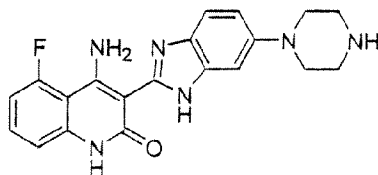
C_{\max} for one of the compounds of about 35 to 6000 ng/mL in the subject's blood. In other embodiments, the amount of the one or more compounds provides a C_{\max} for one of the compounds of about 35 to 1200 ng/mL in the subject's plasma or a C_{\max} for one of the compounds of about 50 to 2400 ng/mL in the subject's blood. In some embodiments, the compound of formula:



a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer is administered to the subject. In other embodiments, the compound of formula:

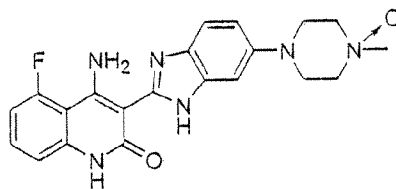


a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer is administered to the subject. In yet other embodiments, the compound of formula:



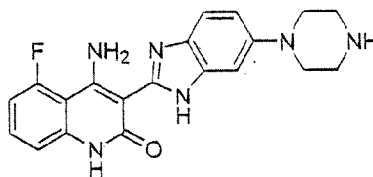
a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer is administered to the subject.

[0061] In determining the safety and/or efficacy of a compound of formula I for a particular disease, it is important to be able to monitor the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the compound in a subject after administration of the compound. Thus, in accordance with one aspect of the invention, there are provided methods for determining a metabolic profile for a compound of formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in a subject. The method includes measuring the amount of at least one metabolite of the compound in one or more samples of urine, blood, or tissue taken from the subject. Metabolites that may be measured by the method include an N-oxide compound having formula II:



II

also known as 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methyl-4-oxidopiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one, and the N-desmethyl compound having formula III:



III

also known as 4-amino-5-fluoro-3-[6-(piperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one. In some such methods of determining the metabolic profile of a compound of formula I, the methods include measuring the amount of the metabolite of formula II and the metabolite of formula III. The amounts of metabolites may be measured using techniques well known to

those skilled in the art, including ultraviolet (UV) spectroscopy or liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS).

[0062] In other aspects of the invention, there are provided methods of determining the amount of a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer in a subject. The method includes measuring the amount of the compound in a sample of urine, blood, or tissue taken from the subject after the compound has been administered to the subject. This method may further include measuring the amount of a metabolite of the compound in the sample. Metabolites that may be measured include, but are not limited to, the N-oxide compound of formula II and/or the N-desmethyl compound of formula III. In some embodiments, the method further includes withdrawing two or more samples from the subject at different times after the compound of formula I has been administered to the subject.

[0063] In another aspect, there is provided the compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, for use in a method of treating cancer comprising administering an amount of said compound to a cancer patient, in an amount sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 20 to 4000 ng/mL of the compound in a subject's plasma or a C_{\max} of about 40 to 8000 ng/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject,
- (b) about 10 to 2,000 ng/mL of the compound in a subject's plasma 24 hours after administration or about 20 to 4,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration to the subject, or
- (c) an AUC of about 500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in a subject's plasma or about 750 to 120,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject.

[0064] In some embodiments of the compound for use in a method of treating cancer, each unit dose is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 50 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's blood,
- (b) about 20 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 40 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or
- (c) an AUC of about 1,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 1,500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

[0065] In other embodiments of the compound for use in a method of treating cancer, each unit dose is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 50 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 100 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood,
- (b) about 40 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or
- (c) an AUC of about 2,000 to 15,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 3,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

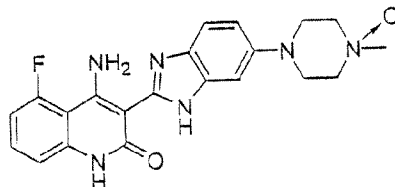
[0066] In still other embodiments of the compound for use in a method of treating cancer, each unit dose is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood, or

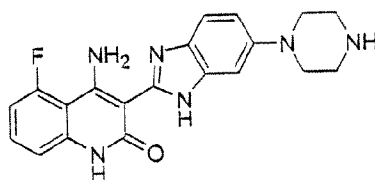
(b) about 40 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration.

In yet other embodiments, each unit dose is sufficient to provide a C_{\max} of about 100 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 200 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood; or each unit dose is sufficient to provide a C_{\max} of 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 200 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's blood.

[0067] There is further provided the use of a metabolite for determining a metabolic profile for a compound having formula I, a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in a subject, the metabolite comprising at least one of an N-oxide compound of formula:



or an N-desmethyl compound of formula:



[0068] The instant invention also provides for compositions which may be prepared by mixing one or more compounds of the instant invention, or pharmaceutically acceptable salts or tautomers thereof, with pharmaceutically acceptable carriers, excipients, binders, diluents or the like, to treat or ameliorate a variety of disorders. Examples of such disorders include, but are

not limited to cancer, including prostate, colorectal, breast, multiple myeloma, pancreatic, small cell carcinoma, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, myelo-proliferative disease, nonsmall cell lung, small cell lung, chronic lymphoid leukemia, sarcoma, melanoma, lymphoma, thyroid, neuroendocrine, renal cell, gastric, gastrointestinal stromal, glioma, brain or bladder. A therapeutically effective dose further refers to that amount of one or more compounds of the instant invention sufficient to result in amelioration of symptoms of the disorder. The pharmaceutical compositions of the instant invention can be manufactured by methods well known in the art such as conventional granulating, mixing, dissolving, encapsulating, lyophilizing, emulsifying or levigating processes, among others. The compositions can be in the form of, for example, granules, powders, tablets, capsules, syrup, suppositories, injections, emulsions, elixirs, suspensions or solutions. The instant compositions can be formulated for various routes of administration, for example, by oral administration, by intranasal administration, by transmucosal administration, by rectal administration, or subcutaneous administration as well as intrathecal, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intraocular or intraventricular injection. The compound or compounds of the instant invention can also be administered in a local rather than a systemic fashion, such as by injection as a sustained release formulation. The following dosage forms are given by way of example and should not be construed as limiting the instant invention.

[0069] For oral, buccal, and sublingual administration, powders, suspensions, granules, tablets, pills, capsules, gelcaps, and caplets are acceptable as solid dosage forms. These can be prepared, for example, by mixing one or more compounds of the instant invention, or pharmaceutically acceptable salts or tautomers thereof, with at least one additive or excipient such as a starch or other additive. Suitable additives or excipients are fructose, sucrose, lactose, cellulose sugar, mannitol, maltitol, dextran, sorbitol, starch, agar, alginates, chitins, chitosans, pectins, tragacanth gum, gum arabic, gelatins, collagens, casein, albumin, synthetic or semi-synthetic

polymers or glycerides, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, and/or polyvinylpyrrolidone. Optionally, oral dosage forms can contain other ingredients to aid in administration, such as an inactive diluent, or lubricants such as magnesium stearate, or preservatives such as paraben or sorbic acid, or anti-oxidants such as ascorbic acid, tocopherol or cysteine, a disintegrating agent, binders, a thickeners, buffers, a sweeteners, flavoring agents or perfuming agents. Additionally, dyestuffs or pigments may be added for identification. Tablets and pills may be further treated with suitable coating materials known in the art.

[0070] Liquid dosage forms for oral administration may be in the form of pharmaceutically acceptable emulsions, syrups, elixirs, suspensions, slurries and solutions, which may contain an inactive diluent, such as water. Pharmaceutical formulations may be prepared as liquid suspensions or solutions using a sterile liquid, such as, but not limited to, an oil, water, an alcohol, and combinations of these. Pharmaceutically suitable surfactants, suspending agents, emulsifying agents, may be added for oral or parenteral administration.

[0071] As noted above, suspensions may include oils. Such oils include, but are not limited to, peanut oil, sesame oil, cottonseed oil, corn oil and olive oil. Suspension preparation may also contain esters of fatty acids such as ethyl oleate, isopropyl myristate, fatty acid glycerides and acetylated fatty acid glycerides. Suspension formulations may include alcohols, such as, but not limited to, ethanol, isopropyl alcohol, hexadecyl alcohol, glycerol and propylene glycol. Ethers, such as but not limited to, poly(ethyleneglycol), petroleum hydrocarbons such as mineral oil and petrolatum; and water may also be used in suspension formulations.

[0072] For intranasal administration (e.g., to deliver compounds to the brain), or administration by inhalation (e.g., to deliver compounds through the lungs), the pharmaceutical formulations may be a solution, a spray, a dry powder, or aerosol containing any appropriate solvents and optionally other

compounds such as, but not limited to, stabilizers, antimicrobial agents, antioxidants, pH modifiers, surfactants, bioavailability modifiers and combinations of these. Examples of intranasal formulations and methods of administration can be found in WO 01/41782, WO 00/33813, WO 91/97947, U.S. Patent No. 6,180,603, and U.S. Patent No. 5,624,898. A propellant for an aerosol formulation may include compressed air, nitrogen, carbon dioxide, or a hydrocarbon based low boiling solvent. The compound or compounds of the instant invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from a nebulizer or the like.

[0073] Injectable dosage forms generally include aqueous suspensions or oil suspensions which may be prepared using a suitable dispersant or wetting agent and a suspending agent. Injectable forms may be in solution phase or in the form of a suspension, which is prepared with a solvent or diluent. Acceptable solvents or vehicles include sterilized water, Ringer's solution, or an isotonic aqueous saline solution. Alternatively, sterile oils may be employed as solvents or suspending agents. Preferably, the oil or fatty acid is non-volatile, including natural or synthetic oils, fatty acids, mono-, di- or tri-glycerides.

[0074] For injection, the pharmaceutical formulation may be a powder suitable for reconstitution with an appropriate solution as described above. Examples of these include, but are not limited to, freeze dried, rotary dried or spray dried powders, amorphous powders, granules, precipitates, or particulates. For injection, the formulations may optionally contain stabilizers, pH modifiers, surfactants, bioavailability modifiers and combinations of these. The compounds may be formulated for parenteral administration by injection such as by bolus injection or continuous infusion. A unit dosage form for injection may be in ampoules or in multi-dose containers.

[0075] Thus, in the present methods of treating cancer described herein, the compound may be administered by injection as a short bolus, slow infusion, or long-term infusion. The injection may be administered once,

twice, three times, or four times daily. A short bolus is generally administered over a period of about 1 to 30 minutes; a slow infusion is generally administered over a period of about 30 minutes to 6 hours; and a long-term infusion is generally administered for a period from over 6 hours up to about seven days.

[0076] For rectal administration, the pharmaceutical formulations may be in the form of a suppository, an ointment, an enema, a tablet or a cream for release of compound in the intestines, sigmoid flexure and/or rectum. Rectal suppositories are prepared by mixing one or more compounds of the instant invention, or pharmaceutically acceptable salts or tautomers of the compound, with acceptable vehicles, for example, cocoa butter or polyethylene glycol, which is present in a solid phase at normal storing temperatures, and present in a liquid phase at those temperatures suitable to release a drug inside the body, such as in the rectum. Oils may also be employed in the preparation of formulations of the soft gelatin type and suppositories. Water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, and glycerols may be employed in the preparation of suspension formulations which may also contain suspending agents such as pectins, carbomers, methyl cellulose, hydroxypropyl cellulose or carboxymethyl cellulose, as well as buffers and preservatives.

[0077] Besides those representative dosage forms described above, pharmaceutically acceptable excipients and carriers are generally known to those skilled in the art and are thus included in the instant invention. Such excipients and carriers are described, for example, in "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), which is incorporated herein by reference.

[0078] The formulations of the invention may be designed for to be short-acting, fast-releasing, long-acting, and sustained-releasing as described below. Thus, the pharmaceutical formulations may also be formulated for controlled release or for slow release.

[0079] The instant compositions may also comprise, for example, micelles or liposomes, or some other encapsulated form, or may be administered in an extended release form to provide a prolonged storage and/or delivery effect. Therefore, the pharmaceutical formulations may be compressed into pellets or cylinders and implanted intramuscularly or subcutaneously as depot injections or as implants such as stents. Such implants may employ known inert materials such as silicones and biodegradable polymers.

[0080] A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound that results in amelioration of symptoms. Specific dosages may be adjusted depending on conditions of disease, the age, body weight, general health conditions, sex, diet of the subject, dose intervals, administration routes, excretion rate, and combinations of drugs. Any of the above dosage forms containing effective amounts are well within the bounds of routine experimentation and therefore, well within the scope of the instant invention. A therapeutically effective dose may vary depending upon the route of administration and dosage form. The preferred compound or compounds of the instant invention is a formulation that exhibits a high therapeutic index. The therapeutic index is the dose ratio between toxic and therapeutic effects which can be expressed as the ratio between LD_{50} and ED_{50} . The LD_{50} is the dose lethal to 50% of the population and the ED_{50} is the dose therapeutically effective in 50% of the population. The LD_{50} and ED_{50} are determined by standard pharmaceutical procedures in animal cell cultures or experimental animals.

[0081] The present invention also provides methods of enhancing anticancer activity in a human or non-human animal. The method comprises administering an effective amount of a compound, or composition, of the instant invention to said mammal or non-human animal. Effective amounts of the compounds of the instant invention include those amounts that inhibit RTK, which are detectable, for example, by an assay herein described, or any other assay known by those skilled in the art that detect signal transduction, in

a biochemical pathway, through activation of G-protein coupled receptors, for example, by measuring an elevated cAMP level as compared to a control model. Effective amounts may also include those amounts which alleviate symptoms of a RTK disorder treatable by inhibiting RTK.

[0082] An RTK disorder, or RTK-mediated disease, which may be treated by those methods provided, include any biological disorder or disease in which an RTK is implicated, or which inhibition of and RTK potentiates a biochemical pathway that is defective in the disorder or disease state. Examples of such diseases are cancers such as prostate, colorectal, breast, multiple myeloma, pancreatic, small cell carcinoma, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, or myelo-proliferative disease.

[0083] Synthesis of compound 1 has been disclosed in U.S. Patent No. 6,605,617. To confirm the identities of compounds 2 and 3, metabolites of compound 1, compounds 2 and 3, were independently synthesized as shown in Example 6.

[0084] The present invention, thus generally described, will be understood more readily by reference to the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended to be limiting of the present invention.

EXAMPLES

[0085] The following abbreviations and terms are used throughout the Examples:

ATP:	Adenosine triphosphate
AUC:	Area under the curve
BSA:	Bovine serum albumin
DMSO:	Dimethylsulfoxide
EDTA:	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERK:	Extracellular regulated kinase
Hepes:	N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HPLC:	High performance liquid chromatography
HMVEC:	Human microvascular endothelial cells
kg:	Kilogram
LC:	Liquid Chromatography
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
MS:	Mass Spectroscopy
MeOH:	Methanol
mg:	Milligram
mL:	Milliliter
MTS:	[3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
nM:	Nanomolar
PBS:	Phosphate buffered saline
NMR:	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
RT-PCR:	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SCF:	Stem Cell Factor
TFA:	Trifluoroacetic acid
T _{1/2} :	Half life – the time required for 50% of a compound to be eliminated from a biological system.
µg:	Microgram(s)
µL:	Microliter(s)
µM:	Micromolar
UV:	Ultraviolet spectroscopy

Example 1

[0086] The antiproliferative activities of 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one (compound 1) were tested against a large number of cancer cell lines and primary non-malignant cell lines. Methods were as follows: Cells were plated in 96-well plates; after three to five hours gelling time for adherent cell lines delusions of the compounds were added, three days later viable cells were determined by adding MTS solution (Promega). Absorbance at 490 nm was measured and EC₅₀ values calculated using non linear regression. For the HMVEC assay, compounds were incubated with the cells for three days in the presence of five ng/mL recombinant VEGF. For the SCF/c-KIT assay the TF-1 and H526 cells were incubated for three days in the presence of 40 ng/mL and 100 ng/mL recombinant SCF, respectively. Proliferation was assayed by adding MTS solution and measuring the absorbance at 490 nm. EC₅₀s were calculated by non-linear regression. Results are shown in Table 1.

[0087] In a subset of the cancer cell lines and the endothelial cells, proliferation was inhibited with EC₅₀ ≤ 50 nM, consistent with their dependence on an RTK targeted by compound 1 (MV4; 11: expression of constitutively active FLT3; HMVEC: VEGFR2 mediated proliferation; TF-1: c-KIT mediated proliferation) with the exception of the KM12L4a cell line. Even though this cell line does express some of the targeted RTKs (e.g., VEGFR ½ and PDGFR determined by RT-PCR), experiments showed that the inhibition of these individual RTKs does not fully explain the potent antiproliferative effects observed with compound 1. This finding suggests that either the inhibition of multiple RTKs or as yet unidentified effects may be responsible for the antiproliferative effect mediated by compound 1 in this cell line.

[0088] The majority of cell lines showed an antiproliferative response when incubated with compound 1 with EC₅₀s between 1 and 10 µM including two primary cell lines HMEC (human normal mammary epithelial cells) and

PrEC (normal human prostate epithelial cells). Consistent with *in vitro* results, the growth of both the KM12L4a and MV4;11 xenografts in mice were potently inhibited by compound 1 *in vivo*.

Table 1

EC ₅₀ ≤ 50 nM	EC ₅₀ 0.4- 1 μM	EC ₅₀ 1-10 μM	EC ₅₀ > 10 μM
MV4; 11 (AML) KM12L4a (colon cancer) HMVEC (VEGF/VEGF R2 mediated; endothelium) TF-1 (SCF/ c-KIT mediated; AML)	RS4 (ALL) 4T1 (mouse breast cancer)	MDA-MB435 (breast cancer) SKOV3 (ovarian cancer) K562 (CML) Ku812 (CML) MOLT-4 (ALL) ARH77 (multiple myeloma) HCT116 (colon cancer) Du145 (prostate cancer) PC3 (prostate cancer) H209 (lung cancer) H226 (lung cancer) HT29 (colon cancer) SW620 (colon cancer) PrC (normal prostate epithelium) HMEC (normal mammary epithelium)	U87 (brain cancer)

^aall cell lines tested were of human origin unless otherwise noted.

Example 2

[0089] Two metabolites of compound 1 were identified and partially characterized in pooled rat plasma from a 2 week toxicology study. Day 1 and day 14 dosed animal plasmas were analyzed by UV and LC/MS from once a day 30 or 80 mg/kg, PO, dose groups. The two identified metabolites were the piperazine N-oxide compound of formula II (compound 2) and the N-

demethylated compound of formula III (compound 3) (see Example 6 for synthesis and characterization of these compounds). Estimated levels of the metabolites (based on UV absorbance and in comparison to known levels of compound 1 quantified in the same samples from previous analyses) are given in Table 2. The N-desmethyl metabolite was found to be in substantially lower abundance than compound 1 in all samples of post dosed pooled plasmas. The N-oxide metabolite was observed to be present in lower abundance than compound 1 except at 24 hours on day 14 in the 80 mg/kg dose group and 1-2 hours on day 1 in the 30 mg/kg dose group (Table 2). The metabolic profile does not change with dose or duration of dose. Generally the metabolite levels increase in tandem with compound 1 levels with dose escalation.

[0090] With both dose groups, the duration of dose, Day 1 vs 14, does not appear to result in an increase in plasma levels of metabolites alone (Table 2) or as compared to compound 1 levels. Compound 1 levels decrease with duration of dose and this is reflected by a decrease in metabolite levels as well. This suggests that time dependent reduction in exposure of compound 1 is not reflected in increased metabolism. The day 14, 24 hr samples contained compound 1 and metabolites at lower levels than the 24 hour samples on day 1 indicating that there is no accumulation of metabolites or compound 1 with a once a day dosage regimen of 30 or 80 mg/kg. The N-oxide metabolite is present in higher abundance than the N-desmethyl metabolite at all assayed time points in the 80 mg/kg dose group and in all but the 24 hr time points after day 1 in the 30 mg/kg dose group. The N-desmethyl metabolite levels appear to fall more slowly than that of compound 1 suggesting a longer $T_{1/2}$ and indicating that the plasma levels of this metabolite are likely determined by its rate of elimination and not its rate of formation as is, in contrast, likely for the N-oxide.

Table 2.: Compound 1 Levels and Estimated Compound 1 Metabolite Levels in Rat Plasma

Dose (mg/kg)	Day	Sample Time (hr)	Des-CH ₃ (ng/ml) ¹	N-oxide (ng/ml) ¹	Compound 1 (ng/ml) ²
30	1	0	0	0	0
30	1	1-2	14	1090	635
30	1	4-8	48	310	943
30	1	24	22	25	54
30	14	0	6	1.3	20
30	14	1-2	6	135	467
30	14	4-8	12	220	442
30	14	24	4	0.4	8
100	1	0	0	0	0
100	1	1-2	35	424	1212
100	1	4-8	84	779	2075
100	1	24	83	137	500
100	14	0	15	67	162
100	14	1-2	17	122	628
100	14	4-8	19	533	1099
100	14	24	10	102	33

1 : Metabolite levels estimated based on metabolite UV absorbance areas in comparison to compound 1 UV areas and using previously reported compound 1 levels. 2: Compound 1 levels previously quantified in a separate study from the same plasma samples analyzed herein.

Example 3

In vitro kinase assays for receptor tyrosine kinases

[0091] The kinase activity of a number of protein tyrosine kinases was measured by providing ATP and an appropriate peptide or protein containing a tyrosine amino acid residue for phosphorylation, and assaying for the transfer of phosphate moiety to the tyrosine residue. Recombinant proteins corresponding to the cytoplasmic domains of the FLT-1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR α , PDGFR β , and FGFR1 receptors were expressed in Sf9 insect cells using a Baculovirus expression system (InVitrogen) and may be purified via Glu antibody interaction (for Glu-epitope tagged constructs) or by Metal Ion Chromatography (for His₆ (SEQ ID NO: 1) tagged constructs). For each assay, test compounds were serially diluted in DMSO and then mixed with an appropriate kinase reaction buffer plus ATP. Kinase

protein and an appropriate biotinylated peptide substrate were added to give a final volume of 50-100 μL , reactions were incubated for 1-3 hours at room temperature and then stopped by addition of 25-50 μL of 45 mM EDTA, 50 mM Hepes pH 7.5. The stopped reaction mixture (75 μL) was transferred to a streptavidin-coated microtiter plate (Boehringer Mannheim) and incubated for 1 hour. Phosphorylated peptide product was measured with the DELFIA time-resolved fluorescence system (Wallac or PE Biosciences), using a Europium labeled anti-phosphotyrosine antibody PT66 with the modification that the DELFIA assay buffer was supplemented with 1 mM MgCl_2 for the antibody dilution. Time resolved fluorescence was read on a Wallac 1232 DELFIA fluorometer or a PE Victor II multiple signal reader. The concentration of each compound for 50% inhibition (IC_{50}) was calculated employing non-linear regression using XL Fit data analysis software.

[0092] FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tie-2, and FGFR1 kinases were assayed in 50 mM Hepes pH 7.0, 2 mM MgCl_2 , 10 mM MnCl_2 , 1 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, 2 μM ATP, and 0.20-0.50 μM corresponding biotinylated peptide substrate. FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, and FGFR1 kinases were added at 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, or 0.1 $\mu\text{g/mL}$ respectively. For the PDGFR kinase assay, 120 $\mu\text{g/mL}$ enzyme with the same buffer conditions as above was used except for changing ATP and peptide substrate concentrations to 1.4 μM ATP, and 0.25 μM biotin-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO: 2) peptide substrate. Each of the above compounds displayed an IC_{50} value of less than 10 μM with respect to FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, and FGFR1.

[0093] Recombinant and active tyrosine kinases Fyn, and Lck are available commercially and were purchased from Upstate Biotechnology. For each assay, test compounds were serially diluted in DMSO and then mixed with an appropriate kinase reaction buffer plus 10 nM ^{33}P gamma-labeled ATP. The kinase protein and the appropriate biotinylated peptide substrate were added to give a final volume of 150 μL . Reactions were incubated for 3-

4 hours at room temperature and then stopped by transferring to a streptavidin-coated white microtiter plate (Thermo Labsystems) containing 100 μ L of stop reaction buffer of 100 mM EDTA and 50 μ M unlabeled ATP. After 1 hour incubation, the streptavidin plates were washed with PBS and 200 μ L Microscint 20 scintillation fluid was added per well. The plates were sealed and counted using TopCount. The concentration of each compound for 50% inhibition (IC_{50}) was calculated employing non-linear regression using XL Fit data analysis software.

[0094] The kinase reaction buffer for Fyn, Lck, and c-ABL contained 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM $MgCl_2$, 30 mM $MnCl_2$, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 25 mM beta-glycerol phosphate, 0.01% BSA/PBS, 0.5 μ M of the appropriate peptide substrate (biotinylated Src peptide substrate: biotin-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH₂ (SEQ ID NO: 3) for Fyn and Lck), 1 μ M unlabeled ATP, and 1 nM kinase.

[0095] The kinase activity of c-Kit and FLT-3 were measured by providing ATP and a peptide or protein containing a tyrosine amino acid residue for phosphorylation, and assaying for the transfer of phosphate moiety to the tyrosine residue. Recombinant proteins corresponding to the cytoplasmic domains of the c-Kit and FLT-3 receptors were purchased (Prokinase). For testing, an exemplary compound, for example 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one, was diluted in DMSO and then mixed with the kinase reaction buffer described below plus ATP. The kinase protein (c-Kit or FLT-3) and the biotinylated peptide substrate (biotin-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO: 2)) were added to give a final volume of 100 μ L. These reactions were incubated for 2 hours at room temperature and then stopped by addition of 50 μ L of 45 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH 7.5. The stopped reaction mixture (75 μ L) was transferred to a streptavidin-coated microtiter plate (Boehringer Mannheim) and incubated for 1 hour. Phosphorylated peptide product was measured with the DELPHIA time-resolved fluorescence system (Wallac or

PE Biosciences), using a Europium-labeled anti-phosphotyrosine antibody, PT66, with the modification that the DELFIA assay buffer was supplemented with 1 mM MgCl₂ for the antibody dilution. Time resolved fluorescence values were determined on a Wallac 1232 DELFIA fluorometer or a PE Victor II multiple signal reader. The concentration of each compound for 50% inhibition (IC₅₀) was calculated employing non-linear regression using XL Fit data analysis software.

[0096] FLT-3 and c-Kit kinases were assayed in 50 mM Hepes pH 7.5, 1 mM NaF, 2 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂ and 1mg/mL BSA, 8 μM ATP and 1 μM of corresponding biotinylated peptide substrate (biotin-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO: 2)). The concentration of FLT-3 and c-Kit kinases were assayed at 2 nM.

IC₅₀s were measured for the metabolites of compound 1 and are shown in Table 3 along with IC₅₀s of compound 1 for comparison.

Table 3.

Compound	IC ₅₀ (μM)					
	VEGFR flt	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
Compound 1	0.010	0.013	0.008	0.027	0.0001	0.0015
Compound 2	0.004	0.009	0.005	0.010	0.0004	0.0002
Compound 3	0.019	0.012	0.019	0.037	0.0001	0.0002

Example 4

[0097] This single agent study evaluated daily oral dosing of compound 1 in the KM12L4a human colon tumor model.

[0098] Female Nu/Nu mice, aged 7-8 weeks (Charles River), were implanted with 2×10^6 KM12L4a cells subcutaneously in the right flank. Treatment began 7 days later when average tumor volume was 125 mm^3 . This was designated as study day 1. Compound 1 was formulated as a solution in 10 mM H_3PO_4 and administered by oral gavage.

[0099] Seven treatment groups were included in the study, ($n=10/\text{group}$): vehicle (water) *p.o.*, *q.d.*; and six groups of compound 1 doses: 3, 10, 30, 100, 200, 300 mg/kg *p.o.*, *q.d.*

[0100] Plasma samples were drawn from satellite animals in each dose group on various days to characterize the pharmacokinetics of compound 1 in tumor-bearing mice ($N=2/\text{timepoint/dose group}$). Tissue and tumor concentrations of compound 1 were determined in samples collected from animals in the 100 and 200 mg/kg dose group at 8 and 24 hours post-dose on Day 22 ($N=2/\text{timepoint/dose group}$).

[0101] Plasma compound 1 concentrations were determined by a non-validated LC/MS/MS assay with a calibration range of 1 to 8000 ng/mL and a lower limit of quantitation (LLOQ) of 1 ng/mL (Charles River Laboratories, Worcester, MA). Tissue and tumor compound 1 concentrations were also determined using a non-validated LC/MS/MS assay with a calibration range of 20 to 43740 ng/g and a LLOQ of 20 ng/g.

[0102] Composite pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC) were obtained using standard noncompartmental analysis from mean plasma compound concentration-time data in each dose group on each sampling day (WinNonlin Professional, version 4). The reported AUC values were determined using 3 concentration-time data points. Predose concentration values were reported as those observed immediately prior to dosing.

[0103] Significant dose-dependent inhibition in tumor growth was observed at all doses by 4-7 days of treatment (see Table 4). The calculated ED_{50} was 17 mg/kg. Tumor regressions of $> 50\%$ of initial size were observed

in the majority of mice dosed with compound 1 at 200 and 300 mg/kg, however these doses were not tolerated for the entire study duration. By days 12-16, mice treated with 300 mg/kg lost 20-30% body weight and were euthanized. In those treated with 200 mg/kg, 1 of 10 was euthanized on day 14 with 22% wt loss, and the remaining mice were euthanized days 21-24 with > 25% weight loss. Mice were dosed for 37 days with 100 mg/kg and remained at 98% of initial weight; tumors remained stable at this dose (Figure 1). The vehicle group was taken down on day 9, and tumor growth inhibition (TGI) was calculated. (Table 4).

Table 4. Dose response activity of Compound 1

Daily dose compound 1 (n=9-10/gp)	Tumor Vol Day 9 Mean \pm SD (mm ³)	Treated/Control	% Tumor Growth Inhibition	P value vs. Vehicle
Vehicle	1333 \pm 283	-	-	-
3 mg/kg	1168 \pm 202	0.88	12	0.1519
10 mg/kg	861 \pm 321	0.65	35	0.0037
30 mg/kg	553 \pm 213	0.42	58	≤ 0.00001
100 mg/kg	263 \pm 108	0.20	80	≤ 0.00001
200 mg/kg	98 \pm 40	0.07	93	≤ 0.00001
300 mg/kg	74 \pm 30	0.06	94	≤ 0.00001

[0104] On the second day of dosing (Day 2), plasma concentrations of compound 1 increased proportionally with dose (Table 5) in all dosing groups. Following multiple dosing for at least 2 weeks, plasma concentrations were comparable to those on Day 2, suggesting no accumulation upon once daily dosing in mice (Table 5). Similarly, predose plasma concentration of compound 1 collected on Days 3, 8, and 15 were similar within each dose group, suggesting that steady state was reached after Day 2. Therefore,

these data suggest that compound 1 follows dose- and time-independent pharmacokinetics in tumor-bearing mice.

[0105] Tumor growth inhibition of 35-60% was observed at doses of 10 and 30 mg/kg, respectively. The corresponding plasma exposure of compound 1, as assessed by C_{\max} and AUC values, ranged from 163-742 ng/mL and 1420-5540 ng*hr/mL, respectively (Figure 2). The corresponding plasma predose concentration values ranged from 2-135 ng/mL.

Table 5. Composite Compound 1 Pharmacokinetic Parameters and Plasma Concentrations-Time Data Following Once-Daily Oral Dosing of Compound 1 to Mice Bearing SC KM1214a Tumors

Dose (mg/kg/day)	Day	Composite Pharmacokinetic Parameters		Mean Plasma Concentrations (ng/mL)			
		C _{max} (ng/mL)	AUC (ng*hr/mL) ¹	Time (hr)			
				0*	2	8	24*
3	2	48	420		48.0	12.7	11.1
	8	--	--	1.55			
10	2	163	1420		163	67.3	2.72
	8	--	--	2.37			
	15	--	--	3.95			
	17	--	--		136	65.8	
30	2	742	5540		742	228	8.42
	8	--	--	7.37			
	15	--	--	23.7			
	17	--	--		416	123	
100	2	1560	18500		1560	1050	97.8
	8	--	--	135			
	15	--	--	54.7			
	22	1550	21200		1550	1330	47.7
200	2	2500	47200		2370	2500	1270
	8	--	--	454			
	15	--	--	434			
	22	1940	31600		1940	1400	1050
300	2	3450	61300		3450	2900	1950
	8	--	--	911			
	15	--	--	1220			
	18	2980	58400		2440	2250	2980

¹ AUC calculated from 3 concentration-time data pairs

-- Not determined

* Predose concentrations

[0106] Tissue concentrations of compound 1 on Day 22 were higher than those in plasma in the 100 and 200 mg/kg dose groups at each of the two sampling times (8 and 24 hours postdose) (Table 6). Brain or heart concentrations of compound 1 were 13- to 34-fold higher than those in plasma; whereas liver, lung, and kidney concentrations were 40- to 126-fold higher than those in plasma at 8 or 24 hours postdose in these two dose groups. In general, the ratio of tissue-to-plasma concentrations at 8 hours

was comparable to that at 24 hours. Furthermore, tissue concentrations at 24 hours were consistently lower compared to those at 8 hours. Taken together, these results suggest that tissue concentrations of compound 1 appeared to decline in parallel with those in plasma. Therefore, compound 1 appears to be widely distributed into tissues (including brain) relative to plasma but does not accumulate in tissues following multiple oral dosing.

Table 6. Mean Tissue, Tumor and Plasma Concentrations on Day 22 Following Once-Daily Oral Administration of 100 or 200 mg/kg/day compound 1 to KM12L4a Tumor-Bearing Mice

Dose (mg/kg)	Time (hr)	Tissue Concentrations (ng/g)						Plasma Conc (ng/mL)
		Brain	Heart	Kidney	Liver	Lung	Tumor	
100	8	16900	24700	83700	107000	87500	48500	1330
	24	675	1630	3900	5080	3170	16900	47.7
200	8	24200	40400	143000	176000	277000	107000	1400
	24	9160	18700	82800	109000	41600	87900	1050

N=2/timepoint/dose group, except in the 200 mg/kg at 24 hr, where N=1

[0107] Tumor compound 1 concentrations on Day 22 were 37- to 354-fold higher than those in plasma in the 100 and 200 mg/kg dose groups at each of the two sampling times (8 and 24 hours postdose). However, tumor concentrations at 24 hours were only 17 to 65% lower than those at 8 hours postdose in these two dose groups suggesting a somewhat slower elimination rate from tumors compared to that from other normal tissues (such as, brain, heart, liver, lung, and kidneys). Therefore, compound 1 appears to be extensively distributed to tumors relative to plasma but may exhibit preferential retention in tumor relative to plasma or normal tissues.

[0108] In summary, the efficacy and tolerability of compound 1 was dose related, with significant inhibitions after 4 to 7 days of treatment. Tumor regressions were observed at 300 and 200 mg/kg; these doses were tolerated daily for approximately 14 and 21 days, respectively. Weight loss was the

clinical sign associated with toxicity. Doses of 100 mg/kg were tolerated for 37 days with no adverse clinical signs, with tumor growth inhibition of 80% compared to control. 30 mg/kg inhibited growth by 60%. Compound 1 demonstrated dose- and time-independent pharmacokinetics in tumor-bearing mice. Plasma compound 1 C_{max} , AUC, and C_{min} values associated with 35-60% tumor growth inhibition ranged from 163-742 ng/mL, 1420-5540 ng*hr/mL, and 2-135 ng/mL, respectively. Compound 1 was distributed widely to tissues, however did not appear to accumulate in tissues following multiple oral dosing. There was a trend towards preferential retention of compound 1 in tumors relative to other tissues following oral dosing.

Example 5

[0109] This single agent study evaluated intermittent oral dosing of compound 1 in the PC3 human prostate tumor model.

[0110] Male SCID mice, aged 9-10 weeks, were implanted with 5 million PC3 human prostate cells subcutaneously in the flank. Treatment began when tumors reached 150 mm³. This was designated as study day 1. Compound 1 was formulated as an aqueous solution and administered by oral gavage.

[0111] Five treatment groups were included in the study, (n = 10/group): Vehicle (water) *p.o.*, *q.d.*; and four groups of compound 1 doses of 100 mg/kg *q.d.*, *q.2.d.*, *q.3.d.*, *q.4.d.*

[0112] As shown in Table 7 significant and similar tumor inhibition results were observed in all treatment groups. The study was suspended for the daily dosing group on day 11. The study was terminated on study day 25 for the remaining groups and mean tumor volume was measured and compared to vehicle. As a clinical indication of toxicity percentage weight loss was measured for each group.

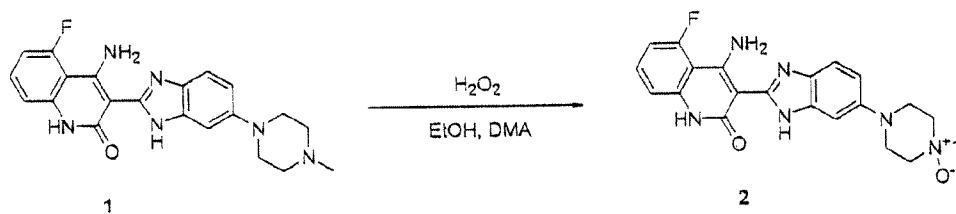
Table 7

Group	n	Total doses compound 1	Mean Tumor Volume day 25	% TGI vs. vehicle	Mean % Wt. loss (range)
Vehicle	10		2011		13 (1-24%)
100 mpk q d, days 1-11	8	11	790	60%	12 (3-35%)
100 mpk q 2 days	10	13	507	75%	4 (0-13%)
100 mpk q 3 days	10	9	645	68%	4 (0-11%)
100 mpk q 4 days	9	7	686	66%	10 (5-17%)

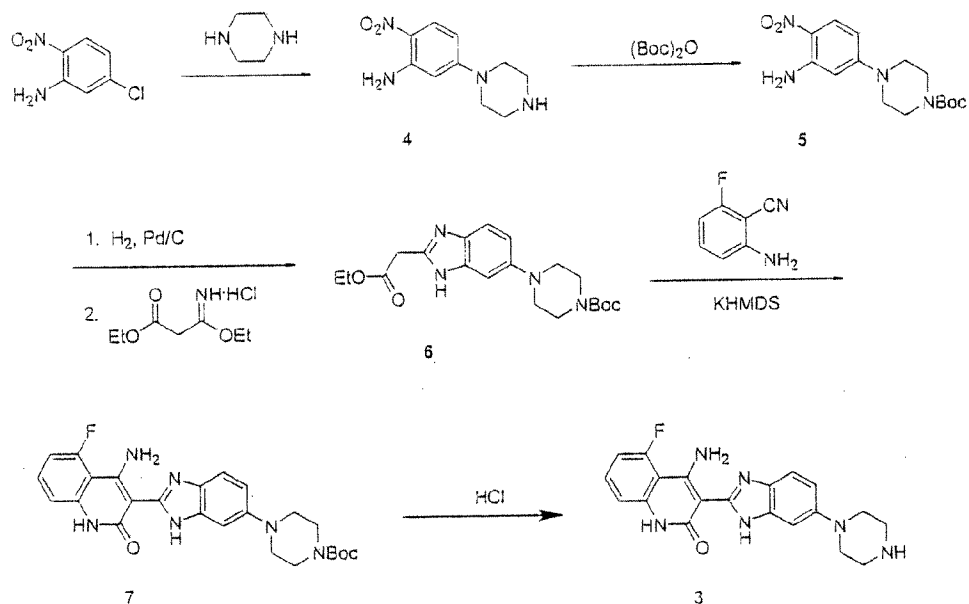
Example 6

[0113] To confirm the structures of the identified metabolites of compound 1, the metabolites were independently synthesized.

[0114] Compound 2, the N-oxide metabolite of compound 1, was synthesized as shown in the scheme below. Compound 1 was heated in a mixture of ethanol, dimethylacetamide and hydrogen peroxide. Upon completion of the reaction, compound 2 was isolated by filtration and washed with ethanol. If necessary, the product could be further purified by column chromatography.

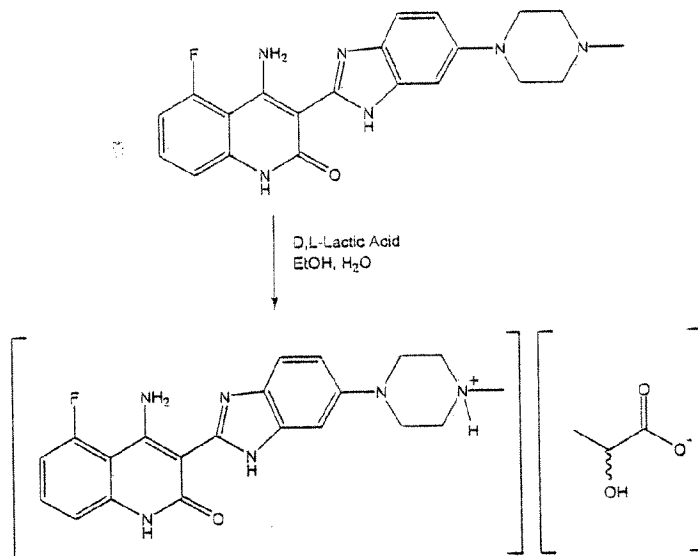


Compound 3, the N-desmethyl metabolite of compound 1, was synthesized as shown in the scheme below. 5-Chloro-2-nitroaniline was treated with piperazine to yield 4 which was subsequently protected with a butyloxycarbonyl (Boc) group to yield 5. Reduction of the nitro group followed by condensation with 3-ethoxy-3-iminopropionic acid ethyl ester gave 6. Condensation of 6 with 6-fluoroanthranilonitrile using potassium hexamethyldisilazide as the base yielded 7. Crude 7 was treated with aqueous HCl to yield the desired metabolite as a yellow/brown solid after purification.



Example 7

Preparation of Lactic Acid salt of Compound 1



[0115] A 3000 mL 4-necked jacketed flask was fitted with a condenser, a temperature probe, a N₂ gas inlet, and a mechanical stirrer. The reaction

vessel was purged with N₂ for at least 15 minutes and then charged with 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methyl-piperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]-1H-quinolin-2-one (484 g, 1.23 mol). A solution of D,L-Lactic acid (243.3 g, 1.72 mol of monomer-see the following paragraph), water (339 mL), and ethanol (1211 mL) was prepared and then charged to the reaction flask. Stirring was initiated at a medium rate, and the reaction was heated to an internal temperature of 68-72°C. The internal temperature of the reaction was maintained at 68-72°C for 15-45 minutes and then heating was discontinued. The resulting mixture was filtered through a 10-20 micron frit collecting the filtrate in a 12 L flask. The 12 L flask was equipped with an internal temperature probe, a reflux condenser, an additional funnel, a gas inlet an outlet, and an overhead stirrer. The filtrate was then stirred at a medium rate and heated to reflux (internal temperature of about 78°C). While maintaining a gentle reflux, ethanol (3,596 mL) was charged to the flask over a period of about 20 minutes. The reaction flask was then cooled to an internal temperature ranging from about 64-70°C within 15-25 minutes and this temperature was maintained for a period of about 30 minutes. The reactor was inspected for crystals. If no crystal were present, then crystals of the lactic acid salt of 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methyl-piperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]-1H-quinolin-2-one (484 mg, 0.1 mole %) were added to the flask, and the reaction was stirred at 64-70°C for 30 minutes before again inspecting the flask for crystals. Once crystals were present, stirring was reduced to a low rate and the reaction was stirred at 64-70°C for an additional 90 minutes. The reaction was then cooled to about 0°C over a period of about 2 hours, and the resulting mixture was filtered through a 25-50 micron fritted filter. The reactor was washed with ethanol (484 mL) and stirred until the internal temperature was about 0°C. The cold ethanol was used to wash the filter cake, and this procedure was repeated 2 more times. The collected solid was dried to a constant weight at 50°C under vacuum in a vacuum oven yielding 510.7 g (85.7%) of the crystalline yellow lactic acid salt of 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methyl-piperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]-1H-quinolin-2-one.

A rubber dam or inert conditions were typically used during the filtration process. While the dry solid did not appear to be very hygroscopic, the wet filter cake tends to pick up water and become sticky. Precautions were taken to avoid prolonged exposure of the wet filter cake to the atmosphere.

[0116] Commercial lactic acid generally contains about 8-12% w/w water, and contains dimers and trimers in addition to the monomeric lactic acid. The mole ratio of lactic acid dimer to monomer is generally about 1.0:4.7. Commercial grade lactic acid may be used in the process described in the preceding paragraph as the monolactate salt preferentially precipitates from the reaction mixture. Lactic acid monomer is purified according to the following procedure.

Example 8

[0117] This study evaluated the antiangiogenic potential of compound 1 in the FGF supplemented Matrigel model.

[0118] Female BDF1 mice, aged 11-12 weeks (Charles River, Wilmington, MA), were subcutaneously implanted with 0.5 mL Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) supplemented with 2 μ g FGF-2. The FGF-2 supplemented blood vessel formation (neovascularization or angiogenesis) was quantified by measuring hemoglobin levels in the Matrigel plugs following their removal from the animals.

[0119] Oral administration of test article began one day prior to Matrigel implantation and continued once daily for eight doses. Compound 1 was formulated as a solution in 10 mM H₃PO₄. Twelve treatment groups were included: vehicle (10 mM H₃PO₄) *p.o.*, *q.d.* x 8 days (2 control groups; mice implanted with unsupplemented Matrigel (baseline hemoglobin level) or FGF-supplemented Matrigel (positive control); compound 1 dosed at 3, 10, 30, 100, 200, 300 mg/kg *p.o.*, *q.d.* x 8 days. There were 8 mice per group, except for mice dosed at 200 and 300 mg/kg, which were 4 per group.

[0120] Percent inhibition of hemoglobin levels in compound-treated mice compared to mice treated with vehicle indicates the antiangiogenic potency of the compound. Results are expressed as total hemoglobin (mg/dL) per Matrigel plug. The ED₅₀ is defined as the dose that effectively inhibits angiogenesis by approximately 50%. Hemoglobin concentrations were determined in homogenized Matrigel plugs removed from mice and flash frozen, using absorbance spectroscopy with Drabkin's reagent (Sigma Diagnostics, St. Louis MO).

[0121] To evaluate plasma exposures of compound 1, blood was collected 2 and 24 hours after 8 consecutive doses (Day 8). In the 200 and 300 mg/kg dose groups, blood was collected only at the 2 hour timepoint. Plasma concentrations of 1 were determined by a non-validated LC/MS/MS assay with a calibration range of 1 to 8000 ng/mL and a lower limit of quantitation (LLOQ) of 1 ng/mL (Charles River Laboratories, Worcester, MA).

[0122] On Day 8, hemoglobin levels in Matrigel plugs and plasma concentrations of compound 1 were measured. Animals were observed and body weights were measured throughout the study.

[0123] Compound 1 resulted in significant inhibition of hemoglobin concentration in Matrigel plugs at each dose evaluated compared to plugs from vehicle treated animals (Table 8). The calculated ED₅₀ was 2.6 mg/kg. The 3 and 10 mg/kg doses resulted in 54% and 57% inhibition, respectively, whereas the 30, 100, 200 and 300 mg/kg doses reduced hemoglobin to the level of unsupplemented Matrigel, resulting in 70-92% inhibition vs. FGF-supplemented controls. The plasma concentrations of compound 1 at 2 hours post dose on day 8, showed a dose proportional increase with concentrations ranging from 44 ng/mL at 3 mg/kg to 3920 ng/mL at 300 mg/kg (Table 9). All doses were well tolerated and no weight loss was observed.

Table 8. Hemoglobin Concentrations and Dose Dependent Reduction in Hb Concentrations in Matrigel Plugs Inhibition in Matrigel Following Oral Administration of Compound 1

Treatment	n	Mean Hb \pm SD mg/dL	% Hb inhibition vs. Vehicle treatment of Matrigel + FGF	p value t-test vs. vehicle treatment Matrigel FGF
Matrigel alone	8	26 \pm 15		
Matrigel FGF + Vehicle	8	69 \pm 34		
300 mg/kg 1	4	6 \pm 0.8	91 %	0.005
200 mg/kg 1	4	8 \pm 0.3	89 %	0.004
100 mg/kg 1	8	14 \pm 7	80 %	<0.0005
30 mg/kg 1	8	20 \pm 8	71 %	<0.0005
10 mg/kg 1	8	29 \pm 16	58 %	0.010
3 mg/kg 1	8	32 \pm 14	54 %	0.012

Table 9 Plasma Concentrations of Compound 1 Measured After 8 Consecutive Doses

Compound 1 Dose (mg/kg/day)	Mean Plasma Conc @ 2 hr# (ng/mL)	Mean Plasma Conc @ 24 hr# (ng/mL)
3	44	0 ^a
10	123	0 ^a
30	339	1.4
100	954	24
200	1910	NS
300	3920	NS

^a Plasma concentrations below lower limit of quantitation (\leq 1 ng/mL)

NS = No samples were collected

#samples collected 2 hours and 24 hours after dosing

[0124] Plasma concentrations of 1 (2 hr postdose) increased proportionally with dose. A dose and plasma concentration dependent reduction in hemoglobin content of Matrigel plugs was observed. Plasma

concentrations (2 hr postdose, Day 8) of 44 ng/mL appear to be associated with antiangiogenic activity in this model.

[0125] In summary, the hemoglobin inhibition of compound 1 was dose-dependent, with significant inhibition after 8 days of treatment. Statistically significant hemoglobin inhibition was observed with all doses of compound 1. All doses were well tolerated with no weight loss or adverse clinical signs observed. Compound 1 plasma concentrations (2 hr postdose) of 44 ng/mL were associated with antiangiogenic activity in this model.

Example 9

[0126] The metabolite profile of compound 1 in monkey plasma from a 5 mg/kg BID multiple oral dose study was determined in dose day 1 and 14 samples. One metabolite was identified and characterized by LC/UV and LD/MS/MS resulting from demethylation (compound 3). Parent (P) compound 1 produced an $M+H^+$ ion at $m/z = 393.3$ with a chromatographic retention time of 18.3 minutes. The demethylated metabolite (P-CH₃) was identified with an $m/z = 379.3$ ($M+H^+$) and a chromatographic retention time of 18.1 min. The mass difference of 14 daltons between the metabolite and compound 1 is consistent with a demethylated compound 1. The mass and chromatographic retention of the metabolite was identical to independently synthesized compound 3. The metabolite corresponding to the piperazine N-oxide of compound 1 (N-oxide compound 2) was not detected in plasma at this dose level. The components producing a UV signal at 17.7 and 18.5 minutes in the absorbance chromatogram at 356 nm were determined to be matrix components and not metabolites based on the UV spectral comparisons to compound 1 and due to their presence in blank plasma (time 0 dose day 1).

[0127] The estimated levels of the demethylated metabolite are given in Table 1. The estimated levels of metabolites (in compound 1 equivalents) are based on UV absorbance peak height ratios of metabolite to that of compound 1 obtained in this analysis and extrapolated by factoring the absorbance ratio to the known levels of compound 1 determined in the same samples in a

previous quantitative analytical study. It was found that parent compound was in greater abundance than the metabolite at all pooled time points. The levels of compound 1 were found to be substantially lower in the day 14 samples in parallel with the N-desmethyl metabolite which was essentially undetectable. No other metabolites including conjugated Phase II type metabolites (glucuronide or sulphate) were detected in these plasma samples on day 1 or 14 of dose administration.

Table 10: compound 1 levels and estimated compound 1 metabolite levels in rat plasma (N=2) with multiple oral doses of compound 1 (5 mg/kg, BID).

Dose (mg/kg/day) ^a	Day	Pooled Sample Time (hr)	(P-CH ₃) (ng/ml) ^b	compound 1 (ng/ml) ^c
10	1	0	0	0
10	1	1, 2	8.5	28
10	1	4, 8	31	62
10	1	12, 13, 14, 16, 20, 24	10	21
10	14	0	ND	2
10	14	1, 2	ND	4.2
10	14	4, 8	ND	2.2
10	14	12, 13, 14, 16, 20, 24	ND	3.2

a. Rats were dosed with 5/mg/kg compound 1 BID in 12 hour intervals (T=0 and T=12 hours).

b. Metabolite levels estimated based on metabolite/compound 1 UV response ratios obtained in this study and factored by the known compound 1 levels previously determined in a separate quantitative study.

c. Compound 1 levels presented in this table are averaged values of previously quantified levels from a separate study.

ND: Non detectable

Example 10

[0128] Studies with plasma and tumors collected from mice following treatment with compound 1 were performed to evaluate potential pharmacodynamic endpoints. Analysis of target modulation in KM12L4a tumors after compound 1 treatment indicated that phosphorylation of VEGFR1, VEGFR2, PDGFR β , and FGFR1 were inhibited in a time- and dose-dependent manner. For example, HMVEC cells showed inhibition of VEGF mediated VEGFR2 phosphorylation with an IC₅₀ of about 0.1 μ M. In addition, treatment of endothelial cells with compound 1 inhibited MAPK and Akt phosphorylation mediated by VEGF.

[0129] Furthermore, a time- and dose- dependent inhibition of ERK (MAPK) activation, a downstream target of receptor tyrosine kinases, was observed with IC₅₀s ranging from 0.1 to 0.5 μ M in KM12L4A cells. (KM12L4A cells express PDGFR β and VEGFR1/2 on their surfaces.) KM12L4A cells were incubated 3 h with compound 1 in serum-free DMEM. After the harvest, lysates were separated by SDS-Page and probed with the phosphor-ERK1/2 and ERK1/2 antibodies. For detection, ECL reagents (Amersham) were used. The inhibitory effects of compound 1 on receptor phosphorylation and ERK activation were maintained for 24 hours after treatment. Phosphorylation of ERK1/2 in MV4-11 cells was inhibited by 1 at IC₅₀s of 0.01 to 0.1 μ M in a dose-dependent manner.

[0130] Significant activity was observed *in vivo* in the HCT116 human colon tumor model. In HCT116 tumors, compound 1 inhibited the phosphorylation of ERK (MAPK) in a dose- and time-dependent manner and significant changes in histology analyses of the tumors was observed.

[0131] These PK/PD evaluations in preclinical models indicate that compound 1 showed a dose- and time-dependent inhibition of both the target receptors and the downstream signaling molecule, ERK (MAPK). These studies will aid in the identification of potential biomarkers to support the monitoring of biological activity of compound 1 in clinical trials.

Example 11

[0132] The distribution of radioactivity in tissues after administration of a single oral (PO) dose (5 mg/kg) of ^{14}C -labeled compound 1 (at 4-position of quinolinone ring) to male and female Sprague Dawley (SD) rats was determined by whole-body autoradiography (WBA). Blood and carcasses for WBA were collected at specified time points through 24 hours postdose. Carcasses were frozen in a hexane/dry ice bath, drained, blotted dry, and placed on dry ice or stored at approximately -70°C for at least 2 hours. The frozen carcasses were embedded in chilled carboxymethylcellulose, frozen into blocks along with embedded autoradiographic standards, and stored at -20°C until analysis. Appropriate sections of 40 μm thickness were collected on adhesive tape at 5 levels of interest in the sagittal plane. All major tissues, organs and biological fluids were represented. Phosphorimaging screens were exposed to the sections and scanned and a standard curve created for interpolating tissue concentrations of ^{14}C -1. Plasma was analyzed for concentration of radioactivity by liquid scintillation counting (LSC). Illustrative results are presented in Table 11.

[0133] Following oral administration of ^{14}C -1, radioactivity derived from ^{14}C -1 was widely distributed throughout all tissues by 1 hour postdose, and had reached C_{max} in most tissues by 4 hours postdose. Overall distribution of radioactivity in the tissues of males and females was similar. ^{14}C -1-derived radioactivity was cleared more slowly from tissues than from plasma. In males and females, the highest tissue concentrations of ^{14}C -1, excluding the gastrointestinal tract through 24 hours were detected in the harderian gland, adrenal gland, renal medulla, intra-orbital lacrimal gland, and exorbital lacrimal gland. ^{14}C -1-derived radioactivity crossed the blood/brain barrier after oral dose administration.

Table 11. Tissue: plasma concentration ratios determined by whole-body autoradiography at specified times following a single oral dose of Compound 1 (5 mg/kg) to male rats

	Tissue: Plasma Concentration Ratios			
	Animal Number (Sacrifice Time)			
	1	2	3	4
Tissue	(1 Hour)	4 (Hours)	(10 Hours)	(24 Hours)
Adrenal gland	34.3	33.5	56.0	68.8
Blood	1.84	1.04	1.35	1.06
Bone	0.826	0.679	1.00	1.23
Bone marrow	13.8	23.3	29.7	26.9
Cecum	16.9	11.3	23.7	15.9
Cecum contents	0.484	15.7	356	130
Cerebellum	4.86	2.63	2.47	1.51
Cerebrum	6.16	3.39	3.21	1.71
Cerebral spinal fluid (CSF)	13.7	18.0	24.0	11.5
Diaphragm	14.1	9.00	12.2	6.49
Epididymis	3.61	6.57	9.05	8.53
Esophageal contents	2.90	6.82	1.08	1.15
Esophagus	98.1	17.7	12.3	7.26
Exorbital lacrimal gland	17.0	28.9	39.2	59.9
Eye	0.535	1.01	1.20	1.51
Fat (abdominal)	3.08	1.89	2.04	1.44
Fat (brown)	16.2	20.2	16.2	8.85

	Tissue: Plasma Concentration Ratios			
	Animal Number (Sacrifice Time)			
	1	2	3	4
Tissue	(1 Hour)	4 (Hours)	(10 Hours)	(24 Hours)
Harderian gland	14.3	34.2	128	300
Intra-orbital lacrimal gland	16.3	30.4	42.4	63.0
Kidney	45.1	32.4	49.1	24.3
Large intestinal contents	NA	7.00	454	238
Large intestine	11.6	12.8	21.8	10.9
Liver	121	48.9	45.0	44.7
Lung	47.2	26.9	28.8	16.8
Medulla	4.08	2.76	2.88	1.51
Muscle	5.93	4.64	5.77	2.64
Myocardium	16.8	11.5	11.8	4.62
Nasal turbinates	4.44	6.29	11.9	11.0
Olfactory lobe	3.77	2.27	2.15	1.15
Pancreas	25.7	20.5	29.3	10.5
Pineal gland	23.0	NA	NA	NA
Pituitary gland	20.5	33.9	48.1	21.5
Preputial gland	NA	NA	23.3	41.3
Prostate	7.29	11.4	14.2	11.2

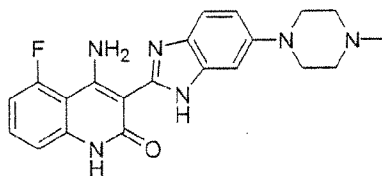
NA Not applicable.

[0134] It is understood that the invention is not limited to the embodiments set forth herein for illustration, but embraces all such forms thereof as come within the scope of the following claims.

CLAIMS

What is claimed is:

1. Use of a compound of formula



a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in the preparation of a medicament, in unit dosage form, for treating cancer, wherein each unit dose of the medicament is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 20 to 4000 ng/mL of the compound in a subject's plasma or a C_{\max} of about 40 to 8000 ng/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject,
 - (b) about 10 to 2,000 ng/mL of the compound in a subject's plasma 24 hours after administration or about 20 to 4,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration to the subject, or
 - (c) an AUC of about 500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in a subject's plasma or about 750 to 120,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject.
2. The use of claim 1, wherein each unit dose is sufficient to provide at least one of
 - (a) a C_{\max} of about 50 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's blood,

(b) about 20 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 40 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or

(c) an AUC of about 1,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 1,500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

3. The use of claim 1, wherein each unit dose is sufficient to provide at least one of

(a) a C_{max} of about 50 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 100 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood,

(b) about 40 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or

(c) an AUC of about 2,000 to 15,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 3,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

4. The use of claim 1, wherein each unit dose is sufficient to provide at least one of

(a) a C_{max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood, or

(b) about 40 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration.

5. The use of claim 1, wherein each unit dose is sufficient to provide a C_{max} of about 100 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood.

6. The use of claim 1, wherein each unit dose is sufficient to provide a C_{max} of 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's blood.

7. The use of any of any one of claims 1-6, wherein the lactate salt of the compound is used to prepare the medicament.

8. The use of any one of claims 1-7, wherein the medicament is suitable for oral administration.

9. The use of claim 8, wherein the unit dosage form of the medicament is a pill, capsule, tablet, gelcap, caplet, suspension, or aqueous solution.

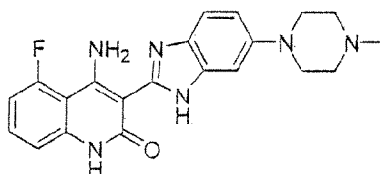
10. The use of any one of claims 1-7, wherein the medicament is suitable for administration by injection as a short bolus, slow infusion, or long-term infusion.

11. The use of any one of claims 1-10, wherein each unit dose of the medicament comprises from 0.25 to 30 mg/kg of the compound, tautomer, and/or salts based on the body weight of the subject.

12. The use of any one of claims 1-10, wherein each unit dose of the medicament comprises an amount of the compound, tautomer, and/or salts ranging from 25 to 1500 mg.

13. The use of any one of claims 1-12, wherein the medicament is arranged in a kit comprising 7, 14, 21 or 28 daily amounts of said unit doses, the kit being suitable for use in a treatment cycle comprises administering the daily amount of the compound for each of 7, 14, 21, or 28 days, followed by 7 or 14 days without administration of the compound.

14. A compound having the formula



a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, for use in a method of treating cancer comprising administering an amount of said compound to a cancer patient, in an amount sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 20 to 4000 ng/mL of the compound in a subject's plasma or a C_{\max} of about 40 to 8000 ng/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject,
- (b) about 10 to 2,000 ng/mL of the compound in a subject's plasma 24 hours after administration or about 20 to 4,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration to the subject, or
- (c) an AUC of about 500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in a subject's plasma or about 750 to 120,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood when it is administered to the subject.

15. The compound of claim 14, wherein each unit dose is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 50 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's blood,
- (b) about 20 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 40 to 2,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or
- (c) an AUC of about 1,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 1,500 to 60,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

16. The compound of claim 14, wherein each unit dose is sufficient to provide at least one of

- (a) a C_{\max} of about 50 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 100 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood,
- (b) about 40 to 500 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 1,000 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration, or
- (c) an AUC of about 2,000 to 15,000 ng*h/mL of the compound in the subject's plasma or about 3,000 to 30,000 ng*h/mL of the compound in the subject's blood.

17. The compound of claim 14, wherein each unit dose is sufficient to provide at least one of

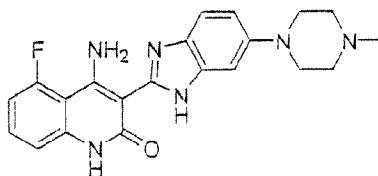
- (a) a C_{\max} of about 75 to 150 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{\max} of about 150 to 300 ng/mL of the compound in the subject's blood, or

(b) about 40 to 250 ng/mL of the compound in the subject's plasma 24 hours after administration or about 80 to 500 ng/mL of the compound in the subject's blood 24 hours after administration.

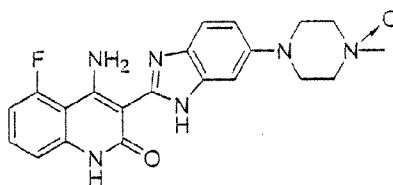
18. The compound of claim 14, wherein each unit dose is sufficient to provide a C_{max} of about 100 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 4000 ng/mL of the compound in the subject's blood.

19. The compound of claim 14, wherein each unit dose is sufficient to provide a C_{max} of 100 to 1000 ng/mL of the compound in the subject's plasma or a C_{max} of about 200 to 2000 ng/mL of the compound in the subject's blood.

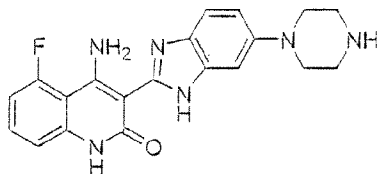
20. The use of a metabolite for determining a metabolic profile for a compound having the formula:



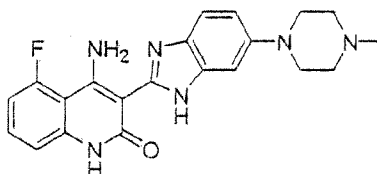
a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in a subject, the metabolite comprising at least one of an N-oxide compound of formula:



or an N-desmethyl compound of formula:

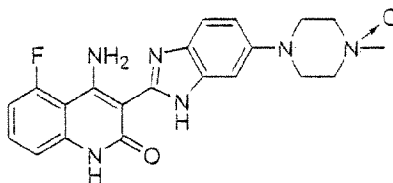


21. A method for determining a metabolic profile for a compound having the formula:

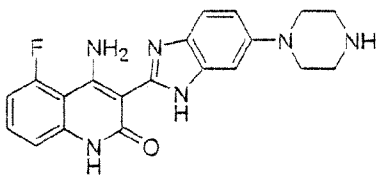


a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in a subject, the method comprising measuring the amount of at least one metabolite of the compound in one or more samples of urine, blood, or tissue taken from the subject.

22. The method of claim 21, wherein the at least one metabolite is an N-oxide compound having the formula:



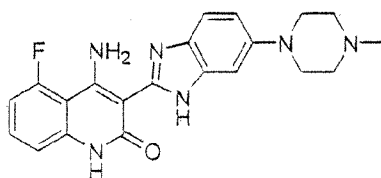
or is an N-desmethyl compound having the formula:



23. The method of claim 22, wherein the method comprises measuring the amount of both the N-oxide compound and the N-desmethyl compound.

24. The method of any one of claims 21-23, wherein the metabolite is measured by ultraviolet spectroscopy or liquid chromatography-mass spectroscopy.

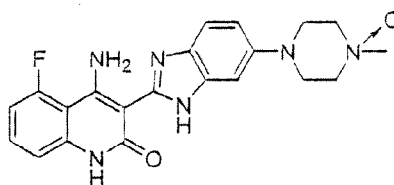
25. A method of determining the amount of a compound having the formula:



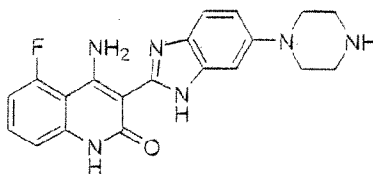
a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer in a subject, the method comprising measuring the amount of the compound in a sample of urine, blood, or tissue taken from the subject after the compound has been administered to the subject.

26. The method of claim 25, further comprising measuring the amount of a metabolite of the compound in the sample.

27. The method of claim 26, wherein the metabolite is an N-oxide compound having the formula:

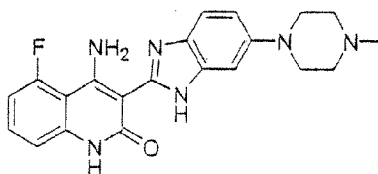


28. The method of claim 26, wherein the metabolite is an N-desmethyl compound having the formula:



29. The method of claim 25, further comprising withdrawing two or more samples from the subject at different times after the compound has been administered to the subject.

30. Use of a compound of formula



a pharmaceutically acceptable salt thereof, a tautomer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt of the tautomer, in the preparation of a medicament, in unit dosage form, for treating cancer, wherein each unit dose of the medicament comprises the compound in an amount of from 25 mg to 1000 mg.

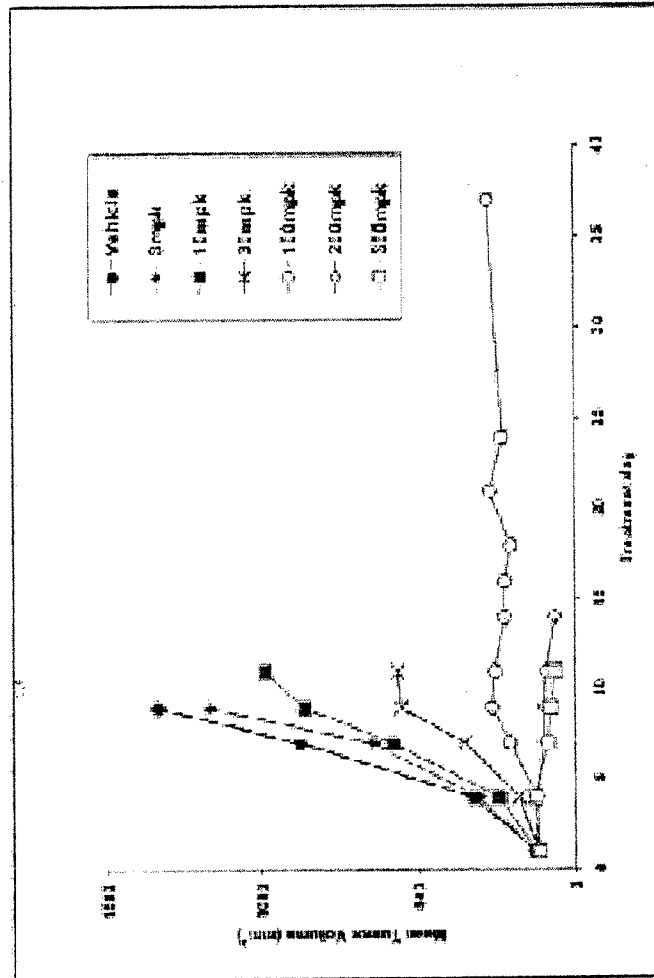
ABSTRACT

METHODS OF TREATING CANCER AND RELATED METHODS

Methods of treating cancer using 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one are provided. In particular, the methods are effective for the treatment of solid tumors or leukemias, including prostate, colorectal, breast, multiple myeloma, pancreatic, small cell carcinoma, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, or myelo-proliferative disease. Further provided are methods of measuring the amount of 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2(1H)-one and determining a metabolic profile therefore.

1/2

FIG. 1



2/2

FIG. 2

